

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

---

---

**Весела Валентинова Лозанова**

**Ефекти на антиоксидантите върху  
каспазно-киназните регулаторни  
пътища при моделни клетъчни линии**

**АВТОРЕФЕРАТ**

*на дисертационна работа за присъждане на образователната и научна  
степен*

*„ДОКТОР“*

*Научна специалност: Биохимия*

**Научен ръководител:**

**Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

София, 2019 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

---

---

**Весела Валентинова Лозанова**

**Ефекти на антиоксидантите върху  
каспазно-киназните регулаторни  
пътища при моделни клетъчни линии**

**АВТОРЕФЕРАТ**

*на дисертационна работа за присъждане на образователната и научна степен*

*„ДОКТОР“*

*Научна специалност: Биохимия*

**Научен ръководител:**

**Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

**Рецензенти:**

**Чл.-кор. проф. Румен Георгиев Панков, дбн**

**Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб**

София, 2019 г.

Дисертационният труд е написан на 96 страници и включва 32 фигури и 3 таблици. Библиографският списък съдържа 202 литературни източника, всичките на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрен съвет на Катедрата по медицинска химия и биохимия при Медицински факултет на Медицински университет, София на 13.12.2018 г. (Протокол №365/13.12.2018).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 25.03.2019. от \_\_\_\_ часа в \_\_\_\_\_ на Медико-биологичния комплекс (МБК; бивш ПУЦ) на Медицински факултет, Медицински университет, София, ул. „Здраве“ 2, съгласно Заповед на ректора № РК36-74/24.01.2019г. пред научно жури в състав:

Председател:

1. Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн – вътрешен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София, научен ръководител на докторанта.

Членове:

2. Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб – вътрешен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София.
3. Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн – външен член за МУ-София, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – Българска академия на науките.
4. Чл.-кор. проф. Румен Георгиев Панков, дбн – външен член за МУ-София, Софийски университет „Св. Климент Охридски“ – Биологически факултет.
5. Проф. Татяна Иванова Влайкова, дб – външен член за МУ-София, Тракийски университет – Стара Загора.

Резервни членове:

1. Доц. Ивайло Петров Иванов, дх – вътрешен резервен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София.
2. Проф. Магдалена Иванова Чорбаджиева, дб – външен резервен член за МУ-София, СУ „Св.Климент Охридски“ – Биологически факултет.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по медицинска химия и биохимия (стая 304, МБК, ул. „Здраве“ 2, София) и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

*\*В автореферата номерата на фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд. Номерата на литературните източници в автореферата съответстват на номерата в дисертационния труд.*

# СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения .....	5
ВЪВЕДЕНИЕ .....	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	7
<i>Цел</i> .....	7
<i>Задачи</i> .....	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	8
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	13
<i>Ефекти от третирането с ROSK инхибитора Y-27632 върху пролиферативния капацитет и активността на сенесценс-асоциираната бета галактозидаза при нормални и имортализирани човешки кератиноцити</i> .....	13
<i>Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс</i> .....	19
<i>Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, третирани с инхибитора Y27632, в хода на настъпване на репликативен сенесценс</i> .....	26
<i>Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани човешки кератиноцити</i> .....	28
<i>Western блот анализи</i> .....	31
<i>Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки кератиноцити</i> .....	35
<i>Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху генерирането на свободни радикали (ROS) при нормални човешки кератиноцити</i> .....	42
ИЗВОДИ .....	47
НАУЧНИ ПРИНОСИ .....	49
SUMMARY .....	52

## Използвани съкращения

<b>aSMase</b>	Acid sphingomyelinase (кисела сфингомиелиназа)
<b>BODIPY</b>	Boron dipyrromethene (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)
<b>BODIPY-SM</b>	BODIPY-Sphingomyelin (сфингомиелин, конюгиран с флуоресцентното багрило BODIPY)
<b>DCF</b>	2',7'-dichlorofluorescein
<b>DCFDA</b>	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
<b>DHQ</b>	Dihydroquercetin (дихидрокверцитин)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor (епидермален растежен фактор)
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor (рецептор на епидермалния растежен фактор)
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases (кинази, регулирани от извънклетъчни сигнали)
<b>FBS</b>	Fetale bovine serum (фетален телешки серум)
<b>hTERT</b>	Telomerase reserve transcriptase (обратна транскриптаза на теломеразата)
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases (Митоген-активирани протеин кинази)
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	Methyl-beta-cyclodextrin (Метил-бета-циклодекстрин)
<b>NAK</b>	Normal adult keratinocytes (нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид)
<b>nSMase1</b>	Neutral sphingomyelinase 1 (неутрална сфингомиелиназа 1)
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (инхибитор на циклин-зависимите кинази 2A)
<b>Q</b>	Quercetin (кверцитин)
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinases (Rho-свързани протеин кинази)
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species (реактивни форми на кислорода)
<b>SA<math>\beta</math>Gal</b>	Senescence-associated beta-galactosidase (сенесценс-асоциирана бета галактозидаза)
<b>SMS2</b>	Sphingomyelin synthase 2 (сфингомиелин синтаза 2)

## ВЪВЕДЕНИЕ

Каспазно-киназните регулаторни пътища представляват едни от най-основните регулаторни пътища в клетките на бозайниците и човека и имат отношение към редица физиологични и патофизиологични процеси. От изключително значение е участието на каспазни и киназни ензими както в регулацията, така и в осъществяването на разнообразните програми, отговорни за индукцията и прогресията на програмираната клетъчна смърт, а също така и за процесите на клетъчно стареене и крайна диференциация.

Клетъчното стареене или сенесценс представлява стабилен арест в клетъчния цикъл, наблюдаван за пръв път при клетки, намиращи се в условията на клетъчна култура, който впоследствие е установен и *in vivo*. Въпреки че молекулните механизми, контролиращи избора на клетката между регулирана клетъчна смърт и сенесценс не са напълно изяснени, е добре известно, че по време на ембрионалното развитие процесите на клетъчно стареене и на апоптоза могат, при определени условия, да бъдат взаимозаменяеми и да компенсират недостатъци или дефекти в някоя от двете клетъчни програми. Старееенето по време на следембрионалното развитие доскоро не е било обект на задълбочени изследвания, поради което наличната информация в научната литература е ограничена. Сенесценсът на нормални човешки кератиноцити, поставени в условията на монокултура, също не е бил обект на задълбочени изследвания и наличната информация в научната литература е крайно недостатъчна.

В последните години изследванията на липидния състав и структура на биологичните мембрани привлякоха вниманието на научната общност, главно заради установяването на връзка между динамичния състав и структура на липидните домени в плазмената мембрана и процесите на клетъчна сигнализация, както при нормални физиологични условия, така и при патологични състояния. Един от основните проблеми и следователно важно предизвикателство при разгадаването на структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални кератиноцити е нейната сложна архитектура и технологичните ограничения на наличните методологии за визуализация на липидните рафтове.

В последните няколко години интереса на научната общност е насочен към разкриването на молекулните механизми на клетъчното стареене в контекста на нормалната физиология на организма с цел модулирането на тези механизми и/или на тяхната регулация да бъдат използвани за разработването на терапии за свързани с възрастта заболявания, включително и голям брой от невродегенеративните заболявания, а също така и за забавяне на физиологичното стареене на организма.

Природните продукти, включително и антиоксидантните съединения, представляват интерес при разработването на разнообразни терапевтични стратегии, както за повлияване на патофизиологични процеси, а също така и като модулатори на различни физиологични процеси, включително и на процесите на клетъчна смърт и стареене. Едни от най-широко разпространените в природата представители на групата на флавоноидите са кверцитина и дихидрокверцитина, чиито ефекти върху нормални човешки кератиноцити не са били обект на задълбочени научни изследвания.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### ***Цел***

Да се изучат ефектите от третиране с инхибитори на Rho-свързаните протеин кинази (ROCK кинази) върху пролиферацията, морфологията и вътреклетъчната сигнализация при нормални човешки кератиноцити с фокус върху процесите на клетъчно стареене и клетъчна смърт. Да се проучат ефектите на други биологично активни молекули върху процесите на клетъчна смърт и клетъчно стареене.

### ***Задачи***

1. Определяне на ефектите от третиране с ROCK инхибитора Y27632 върху пролиферативния капацитет и активността на сенесценс-асоциираната бета галактозидаза (SA $\beta$ Gal) при нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.
2. Изследване на промените в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.
3. Изследване на промените в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, третирани с инхибитора на ROCK киназите Y27632 в хода на настъпване на репликативен сенесценс.
4. Изследване на промените в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.
5. Изследване на ефектите на кверцитин и дихидрокверцитин върху преживяемостта и морфологията на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид.
6. Изследване на ефектите на кверцитин и дихидрокверцитин върху генерирането на свободни кислородни радикали (ROS) при нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### *Използвани разтвори и буфери*

**Разтвор А:** 10 mM глюкоза, 3 mM KCl, 130 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0033 mM Phenol Red и 30 mM HEPES, pH 7.4.

**Разтвор T17:** 0.17% трипсин, разтворен в разтвор А.

**Разтвор T25:** 0.025% трипсин и 0.01% EDTA, разтворени в разтвор А.

**Диализиран фетален телешки серум (dFBS):** търговски фетален телешки серум (FBS), от който посредством диализа с фосфатен буфер PBS са премахнати калциевите йони.

**Пеницилин/стрептомицин (P/S), 1000x:** 50 000 U/mL пеницилин G и 50 000 µg/mL стрептомицин, добавени към разтвор А. При добавянето към културалната среда се получават крайни концентрации от 50 U/mL пеницилин G и 50 µg/mL стрептомицин.

**Гентамицин/амфотерицин (G/A), 1000x:** 50 000 µg/mL гентамицин, 250 µg/mL фунгизон и 250 µg/mL ампицилин, добавени към разтвор А. При добавянето към културалната среда се получават крайни концентрации от 50 µg/mL гентамицин, 0.25 µg/mL фунгизон и 0.25 µg/mL ампицилин.

**Разтвор на аминокиселини:** 1.677g L-хистидин, 3.280g L-изолевцин, 0.448g L-метионин, 0.306g L-триптофан и 0.453g L-тирозин, разтворени при нагряване в 1 000 mL дейонизирана вода. При добавянето към културалната среда се получават крайни концентрации от 0.05 g/L хистидин, 0.1 g/L изолевцин, 0.014 g/L метионин, 0.009 g/L триптофан и 0.014 g/L тирозин.

**Хидрокортизон:** стоков разтвор (5 mg/mL) се приготвя при разтваряне на хидрокортизон в етанол, впоследствие разтвора се разрежда до концентрация 0.2 mg/mL с разтвор А. При добавянето към културалната среда се получава крайна концентрация 0.2 µg/mL хидрокортизон.

**TBS буфер, 10x:** 30.285 g/L Trizma base, 3.23 g/L KCl и 81.81 g/L NaCl, pH 7.6.

**Фосфатен буфер PBS:** 0.2g KCl, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.0g NaCl и 1.45g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7.4

### *Използвани клетъчни линии и среди за култивиране*

- Нормални човешки кератиноцити, изолирани от възрастен индивид (NAK).
- hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.
- Културална среда KBM-2<sup>®</sup> (Lonza) при краткосрочно култивиране.
- Културална среда Epilife<sup>®</sup> (Gibco) при продължително култивиране.

**Таблица 1. Използвани среди за култивирането на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид и hTERT-имортализирани кератиноцити**

Компоненти	Среда за установяване на културата	Среда за растеж на културата	Среда за автокринен растеж на културата
Базална среда	KBM-2 <sup>®</sup> (Lonza)	Eplife <sup>®</sup> (Gibco)	KBM-2 <sup>®</sup> (Lonza) или Eplife <sup>®</sup> (Gibco)
Телеишки екстракт от хипофиза (BPE)	50 µg/mL	2 µg/mL	—
Епидермален растежен фактор (EGF)	10 ng/mL	0.2 ng/mL	—
Инсулин	5 µg/mL	5 µg/mL	—
Хидрокортизон	0.18 µg/mL	0.18 µg/mL	0.2 µg/mL
Трансферин	5 µg/mL	5 µg/mL	—
Антибиотици	G/A или P/S	G/A или P/S	P/S
Аминокиселини	—	—	His, Ile, Met, Trp, Tyr

\*G/A = гентамицин (50 µg/mL) + ампицилин (0.25 µg/mL) + фунгизон (0.25 µg/mL)

\*\*P/S = пеницилин G (50 U/mL) + стрептомицин (50 µg/mL)

*Изолиране, поддържане и криосъхранение на първични кератиноцитни култури от кожа на възрастни индивиди*

- Съгласно методиката на Minner и сътрудници [167].
- Кожни експлантати от възрастни пациенти на Клиниката по пластично-възстановителна и естетична хирургия (КПВХ) към УМБАЛ „Александровска“, гр. София и от Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Белгия.
- Стандартна методология за поддържането и криосъхранението на кератиноцитните култури.

*Индукция на сенесценс при кератиноцитни култури*

- Посредством поддържането на културата в пролиферативно състояние за продължителен период от време [169].
- Оценка за репликативния капацитет на база на интервала от време между две последователни пасажира на културата и/или процентното съдържание на SaβGal позитивни клетки.

*Третираня на клетките*

- Репресия на репликативния сенесценс – 10 µM ROCK инхибитор Y27632 добавен към пълноценна или автокринна културална среда.
- Извличане на холестерола от клетъчната мембрана – 7.5 mM метил-бета-циклодекстрин (MβCD).

- Активация на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR) – 10 ng/mL епидермален растежен фактор (EGF).
- Третирания с биологично-активни вещества – кверцитин и дихидрокверцитин в концентрационния диапазон от 5 до 100  $\mu$ M, добавени към автокринна културална среда.

*Определяне на клетъчната преживяемост посредством оцветяване с MTT*

- Спектрофотометрично определяне чрез оцветяване на клетките с 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide (MTT).
- Определяне на абсорбцията при дължина на вълната 540 nm.

*Определяне на клетъчната преживяемост посредством оцветяване с Crystal Violet*

- Спектрофотометрично определяне посредством методологията на Feoktistova и сътрудници [171].
- Определяне на абсорбцията при дължина на вълната 540 nm.

*Определяне на генерирането на ROS чрез оцветяване с 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетат (DCFDA)*

- Основава се на определянето на количеството дихлорофлуоресцеин (DCF), получен при окислението на DCFDA под действие на вътреклетъчни ензими.
- Флуоресцентна детекция на DCF при дължина на вълната на възбуждане 485 nm и дължина на вълната на емисия 535 nm.

*Оцветяване на клетките за активност на сенесценс-асоциираната бета-галактозидаза (SA $\beta$ Gal) –*

- Съгласно методологията на Debacq-Chainiaux и сътрудници [109, 172].

*Маркиране на живи кератиноцити с флуоресцентни проби и анализ на изображенията –*

- Култивиране на нормални човешки кератиноцити в Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific, NY, USA).
- Визуализация на мембранните липидни домени при живи клетки чрез lysenin\* (ендогенен сфингомиелин), theta\* (ендогенен холестерол) и BODIPY-SM (екзогенен сфингомиелин).
- Анализ на липидните рафтове чрез конфокална микроскопия (Leica) при сила на лазера 16% и увеличение 100x.
- Количественият анализ на колокализацията на пробите с помощта на софтуера Leica LAS-AF-Lite.
- Количественото определяне на липидните субмикрометрични домени с помощта на софтуера Visilog (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) и определяне на броя, интензитета и площта на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на клетката.

### *Екстракция и количествено определяне на сфингомиелин и холестерол*

- Екстракция на липидите с хлороформ/метанол, изсолване, фракциониране и изпаряване на липидните фракции под вакуум.
- Реконструиране на пробите в дейонизирана вода.
- Fluorometric Sphingomyelin Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) за количествено определяне на сфинтомиелин.
- Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) за количествено определяне на холестерол.

### *Изолиране на белтъци и Western блот анализи*

#### Изолиране на белтъците:

- Лизисен буфер - 0.125 M Tris-HCl, 20% (v/v) глицерол, 4% (w/v) натриев додецилсулфат (SDS), 0.2 M дитиотреитол (DTT), 1% (w/v) бромфенол блу (редуциращи условия).
- Количествено определяне на белтъчното съдържание - Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific).

#### Едномерна полиакриламидна електрофореза при денатуриращи условия (SDS-PAGE):

- Разделящ гел – 7.5% – 15% акриламид/бисакриламид, 0.375 M Tris/HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% амониев персулфат (APS) и 0.1% TEMED.
- Концентриращ гел - 4% акриламид/бисакриламид, 0.125 M Tris/HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS и 0.1% TEMED.
- Електроден буфер - 25 mM Tris, 192 mM глицин и 0.1% SDS (система на Laemmli; [173]).
- Условия на електрофоретичното разделяне: 20 V, 500 mA, 1.5 часа.

#### Пренос на белтъците:

- „мокър пренос“ върху PVDF мембрани чрез Mini-PROTEAN® електрофорезна система с Mini Trans-Blot модул (Bio-Rad).
- Трансферен буфер - 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM глицин и 20% метанол.
- Условия на преноса: 60 V, 300 mA, 15-16 часа (overnight).
- Rouge Ponceau за визуализация на преноса.

#### Western блот анализ:

- Блокиране на мембраната – 5% обезмаслено сухо мляко в буфер TBST (0.1% Tween 20 към TBS буфер), стайна температура, 1-2 часа.
- Инкубация с първо антитяло - титър 1:1000, 4°C, overnight.
- Промиване с буфер TBST.
- Инкубация с второ антитяло – титър 1:5000, стайна температура, 1-1.5 часа.
- Промиване с буфер TBST.
- Инкубация със субстратен разтвор - BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche).
- Детекция – система Image Quant LAS 4000 mini system (GE Healthcare).

Таблица 2. Използвани антитела при провеждането на Western блот анализите.

Антитяло	Каталожен номер и производител	Блокиране	Титър
<b>Първи антитела</b>			
Phospho-EGFR (Tyr1173), rabbit polyclonal	#44794; Invitrogen	Сухо мляко	1:1000
EGFR, rabbit monoclonal	#4267; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), rabbit polyclonal	#9211; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
p38 MAPK, rabbit polyclonal	#9212; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
Phospho-Akt (Ser473), rabbit polyclonal	#9271; Cell Signaling	BSA	1:1000
Akt, rabbit polyclonal	#9272; Cell Signaling	BSA	1:1000
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), mouse monoclonal	#9106; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
ERK 1/2, rabbit polyclonal	#9102; Cell Signaling	BSA	1:1000
p16 <sup>INK4a</sup> , rabbit monoclonal	#LS-B8693; LifeSpan BioScience	BSA	1:1000
RPL-13a, rabbit polyclonal	#2765; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
<b>Втори антитела</b>			
Anti-rabbit HRP	#7074; Cell Signaling	Сухо мляко	1:5000
Anti-mouse HRP	#7076; Cell Signaling	Сухо мляко	1:5000

*Екстракция на РНК и количествен RT-qPCR*

- Изолиране на тотална РНК - High Pure RNA isolation kit (Roche, Basel, Switzerland).
- Обратна транскрипция - SuperScript II kit (Life Technologies, California, USA).
- Количествен RT-qPCR - SYBR Green Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); 7300 real-time PCR апарат (Life Technologies).
- Количествено определяне на експресията на кисела сфингомиелиназа (aSMase), неутрална сфингомиелиназа 1 (nSMase1), сфингомиелин синтаза 2 (SMS2).
- Количествено определяне на относително съдържание на иРНК на база на разликите в Ct [174].
- Нормализация на база на експресията на гена *RPLP0*.

Таблица 3. Секвенции на използваните праймери при qRT-PCR.

иРНК	Forward primer	Reverse primer
p16 <sup>INK4a</sup>	5'-GCCCAACGCGAATAGT-3'	5'-CGCTGCCCATCATCATGAC-3'
aSMase	5'-GCCCAATCTGCAAAGGTCTATT-3'	5'-CCCACGCGAGCCACAT-3'
nSMase1	5'-CAGGACTTCCAGTACCTGAGAGAGA-3'	5'-GGCCACTGCCAATGATTCC-3'
SMS2	5'-CCTGTGCCTGGAATGCATTT-3'	5'-ATCAATCGTAGAATCCGTTGAACTT-3'
RPLP0	5'-ATCAACGGGTACAAACGAGTC-3'	5'-CAGATGGATCAGCCAAGAAGG-3'

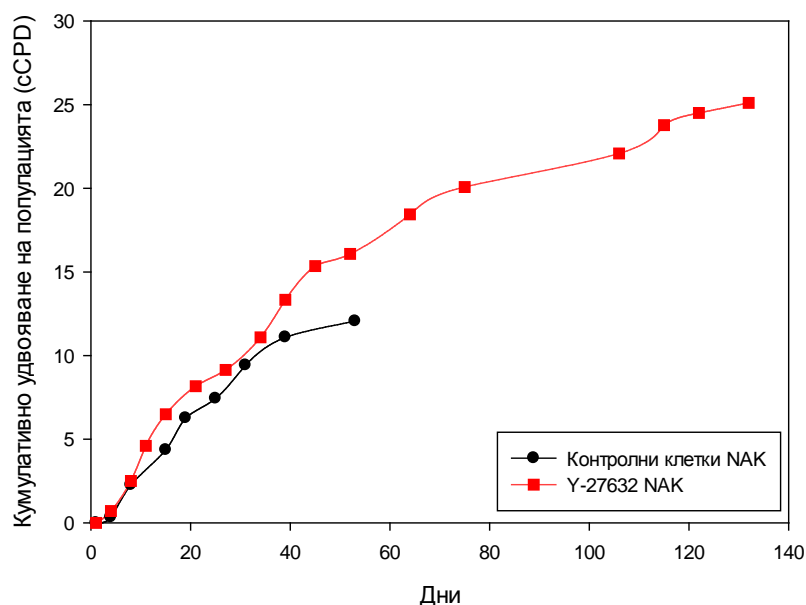
*Статистически анализ на данните*

- Поне по три повторения на експеримента, като се използват минимум два различни донора.
- Средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение (mean  $\pm$  SD), освен ако не е споменато друго.
- Сравняване на групите чрез ANOVA с Bonferroni post-hoc анализ.
- Статистическата значимост, представена на графиките, е както следва: NS (няма статистическа значимост), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

**Ефекти от третирането с ROCK инхибитора Y-27632 върху пролиферативния капацитет и активността на сенесценс-асоциираната бета галактозидаза при нормални и имортализирани човешки кератиноцити**

Y27632 (наименование по IUPAC: 4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-pyridin-4-ylcyclohexane-1-carboxamide) представлява селективен инхибитор на Rho-свързаните кинази (ROCK), за който е известно от научната литература, че повлиява пролиферацията и диференциацията на кератиноцити [175, 176], а също така може да доведе и до имортализация на нормални човешки кератиноцити, отглеждани в присъствието на подложка от имортализирани фибробласти [177]. Поради това си поставихме за задача да установим дали ROCK киназния инхибитор Y27632 е способен да предизвика имортализация на нормални човешки кератиноцити, култивирани при автокринни условия и в отсъствието на подложка от имортализирани фибробласти. За целта, изолираните нормални човешки кератиноцити от възрастен донор (NAK) бяха отглеждани в присъствието или отсъствието на 10  $\mu$ M Y27632 за продължителен период от време в условията на монослойна клетъчна култура.

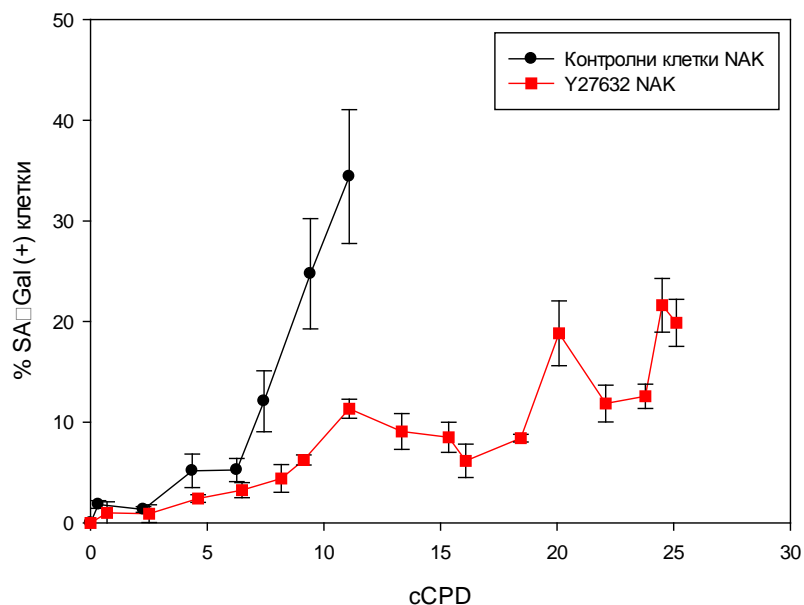


**Фигура 1. Удвояване на клетъчната популация при нормални човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632.**

Нормалните човешки кератиноцити, отглеждани при стандартни условия, в отсъствието на ROCK инхибитора Y27632 достигаха до състояние на репликативен сенесценс около 50тия ден от началото на култивиране, като за това се съдеше по удължения интервал между две последователни пасажира на културата (3-5 дни при ранните пасажи и над 10 дни при късните пасажи) (фигура 1). След провеждането на 10тия пасаж на нормалните кератиноцити, отглеждани в отсъствието на инхибитора Y27632, в продължение на един месец културата не достигна до необходимата конfluентност от 60-70%, за да бъде пасажирана, което доведе до извода, че

кератиноцитите са навлезли в състояние на постоянен, необратим арест в клетъчния си цикъл и са спрели да пролиферират.

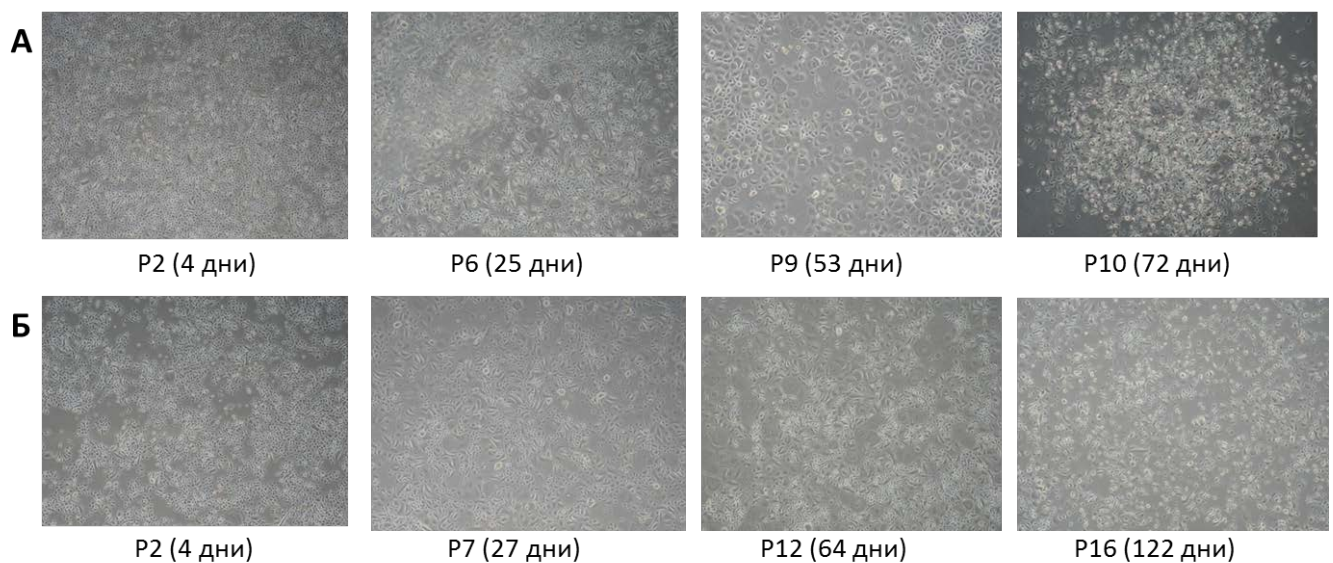
За разлика от контролните клетки, нормални кератиноцити, култивирани в присъствието на 10  $\mu$ M Y27632 продължаваха да се делят и запазваха пролиферативния си потенциал в продължение на над 120 дни като монослойна клетъчна култура (*фигура 1*). Същевременно интервалът между две последователни пасажира на културата се запазваше в рамките на до 10 дни дори и при късните пасажи на културата. На база на тези наблюдения можем да заключим, че в присъствието на ROCK инхибитора Y27632 нормални човешки кератиноцити са способни в значителна степен да запазят пролиферативния си капацитет, като това става независимо от използвания начин на култивиране (като ко-култура с подложка от инактивирани фибробласти или като монокултура, както е при настоящото изследване).



**Фигура 2. Процентно съдържание на SAβGal позитивните клетки при нормални човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632.**

Една от най-характерните биохимични особености на сенесцентните клетки е експресията на специфична сенесценс-асоциирана бета галактозидаза (SAβGal), която има максимална активност при стойности на рН над 6.0, което позволява и отдиференцирането на сенесцентните клетки от други клетки с повишено лизозомално съдържание. При нормалните кератиноцити прогресивно се наблюдаваше повишаване на броя на положителните за този биомаркер клетки, което показва увеличаване на броя на клетките, които са навлезли в състояние на репликативен сенесценс и са загубили пролиферативния си капацитет (*фигура 2*). От друга страна, при нормалните кератиноцити, отглеждани в присъствието на 10  $\mu$ M Y27632 беше установен по-малък процент положителни за SAβGal клетки, като дори при късни пасажи на културата сенесцентните клетки представляваха под 20% от общия брой клетки в културата. Наблюдаваните при третираните с ROCK инхибитора Y27632 временни флукутации на активността на SAβGal (т.е. повишаване на броя положителни клетки) е вероятно да се

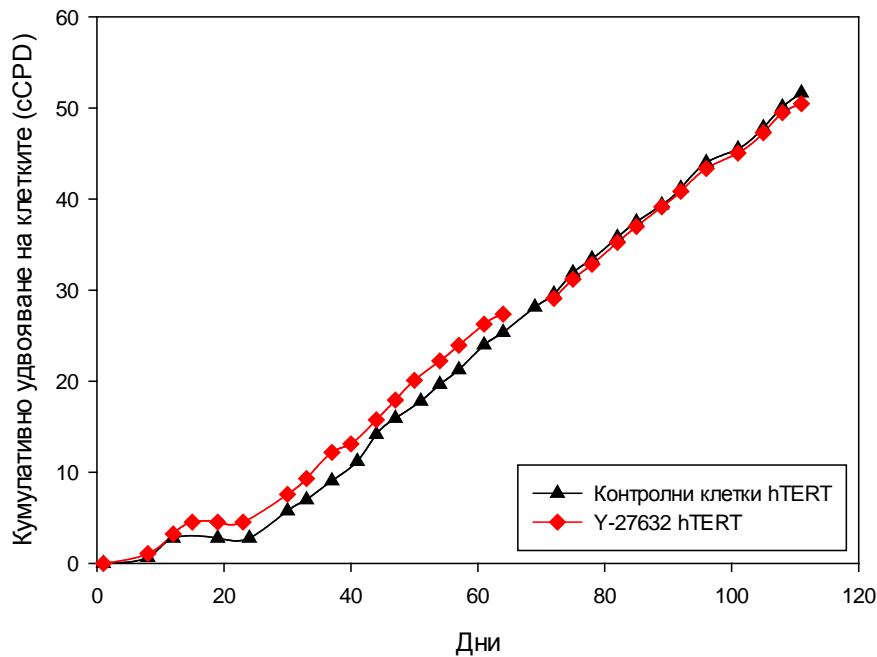
дължат на кратковременно повишаване на броя на положителните за SaβGal клетки, които при последващото пасажиране на културата се загубват и/или намаляват като процентно съдържание поради запазването на пролиферативен капацитет на останалите клетки в културата. Независимо от причината за тези временни флукуации, по-голямата част от кератиноцитите в културата (над 80%) бяха негативни по отношение активността на SaβGal и следователно бяха със запазен пролиферативен капацитет. Това показва, че ROCK киназния инхибитор Y27632 е способен да подпомага преживяемостта на нормални човешки кератиноцити, отглеждани като монокултура без подложка от инактивирани фибробласти, и че клетките, третирани с него, навлизат по-късно в състояние на репликативен сенесценс.



**Фигура 3. Морфологични промени при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс. (А) Контролни клетки. (Б) Клетки, третирани с 10 μM Y27632.**

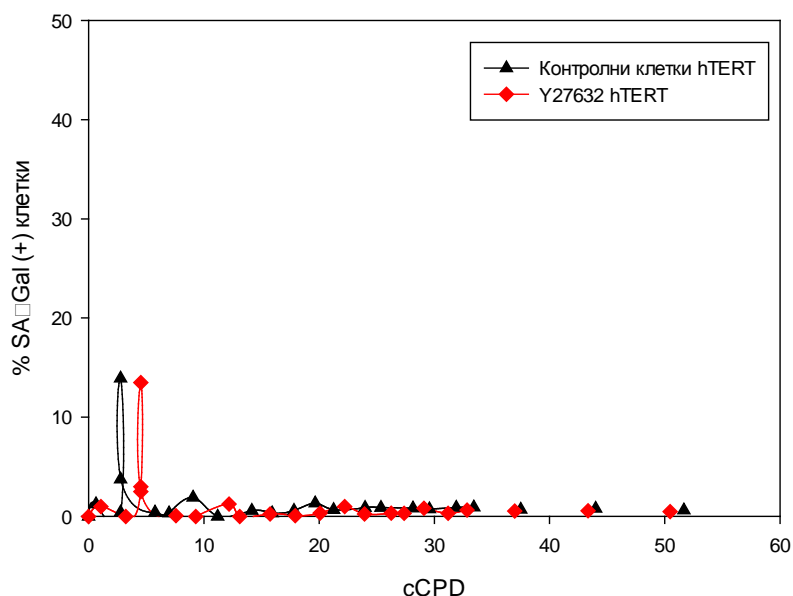
При наблюдаване на морфологията на нормални и третирани с инхибитора Y27632 човешки кератиноцити с помощта на конфокална светлинна микроскопия беше установено, че при ранните пасажи морфологията на клетките и в двете култури е идентична, като клетките бяха с характерната за кератиноцити призматична форма, малки по размери и с относително хомогенна цитоплазма. При продължителното култивиране на нормалните, контролни кератиноцити (*фигура 3А.*) постепенно се наблюдаваше повишаване на броя на клетките, които проявяваха характерна за сенесцентни клетки морфология, включваща увеличаване на клетъчните размери, сферична форма, уголемяване и фрагментация на ядрото, като при последните пасажи на нормалните, нетретирани кератиноцити се оформяха единични колонии с относително голям брой клетки, които обаче не бяха способни да колонизират цялата повърхност на културалните съдове, а по-скоро запазваха размерите си постоянни за продължителен период от време (над 30 дни). Именно удължаването на интервала между две последователни пасажира и невъзможността за достигане на желаната конfluентност на монослоя бяха причина за прекратяването на култивирането на нормалните, нетретирани клетки при достигането на пасаж 10 (на 95тия ден от

началото на култивиране). За разлика от контролните клетки, кератиноцитите, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632 запазваха пролиферативния си капацитет и продължаваха да се делят в продължение на над 120 дни в условията на клетъчна култура. И при третираните с инхибитора Y27632 кератиноцити беше установено навлизане на част от клетките в състояние на репликативен сенесценс, но броя на клетките, проявяващи морфологични черти, характерни за сенесцентните клетки, беше относително малък и тяхното присъствие в културата не повлияваше пролиферативния й капацитет като цяло (фигура 3B).



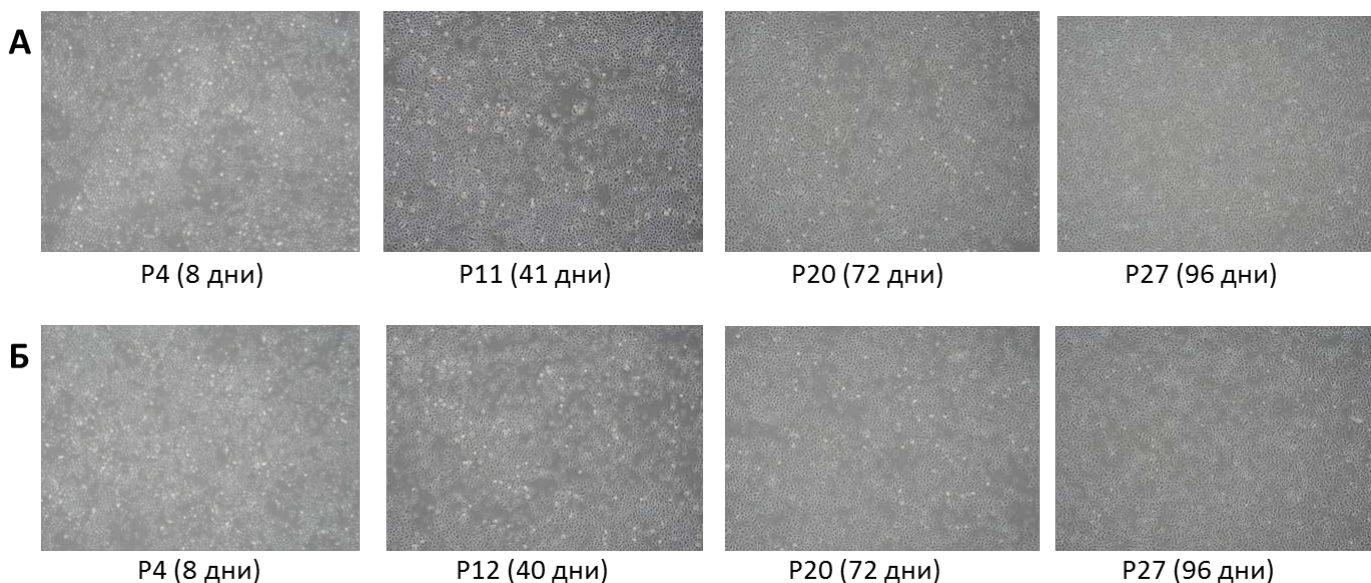
**Фигура 4.** Удвояване на клетъчната популация при имортализирани човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632

Когато аналогичен експеримент беше проведен с hTERT-имортализирани човешки кератиноцити, които са неспособни при стандартни условия на култивиране да навлязат в състояние на репликативен сенесценс, беше установено че третирането с ROCK киназия инхибитор Y27632 не води до промени в пролиферативния капацитет на клетките (фигура 4). И при двете условия на култивиране, в отсъствие или присъствие на инхибитора Y27632, интервала от време между две последователни пасажирания на културата се запазваше в рамките на 3-5 дни през целия период на култивиране на клетките. Имортализираните кератиноцити, запазващи пролиферативния си капацитет, бяха успешно поддържани в условията на клетъчна култура в продължение на над 100 дни без да бъдат забелязани промени в клетъчния цикъл и скоростта на пролиферация.



**Фигура 5. Процентно съдържание на SAβGal позитивните клетки при имортализирани човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632.**

Беше осъществено и оцветяване за биомаркера SAβGal, като независимо от отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632 процентното съдържание на положителните клетки беше под 1% почти през целия период на поддържане на hTERT-имортализираните кератиноцити в условията на клетъчна култура (фигура 5). Известно повишаване на процентното съдържание на SAβGal положителните клетки се наблюдаваше при ранните пасажии на културите (около 20тия ден в култура), което вероятно се дължеше на временно натрупване на по-голям брой сенесцентни клетки, които впоследствие изчезваха (или намаляваха значително) поради запазения пролиферативен капацитет на по-голямата част от кератиноцитите в културата.



**Фигура 6. Морфологични промени при hTERT-имортализирани кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс. (А) Контролни клетки. (Б) Клетки, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632.**

По отношение на морфологията на hTERT-имортализираните човешки кератиноцити не бяха установени макроскопични промени в структурата на клетките, като и при късните пасажии на културата кератиноцитите запазваха характерната си морфология и в културалните съдове при детайлно разглеждане можеше да бъдат забелязани само единични клетки с леко изменена морфология, наподобяваща наблюдаваната при ранните стадии на репликативния сенесценс при нормалните човешки кератиноцити (*фигура б*).

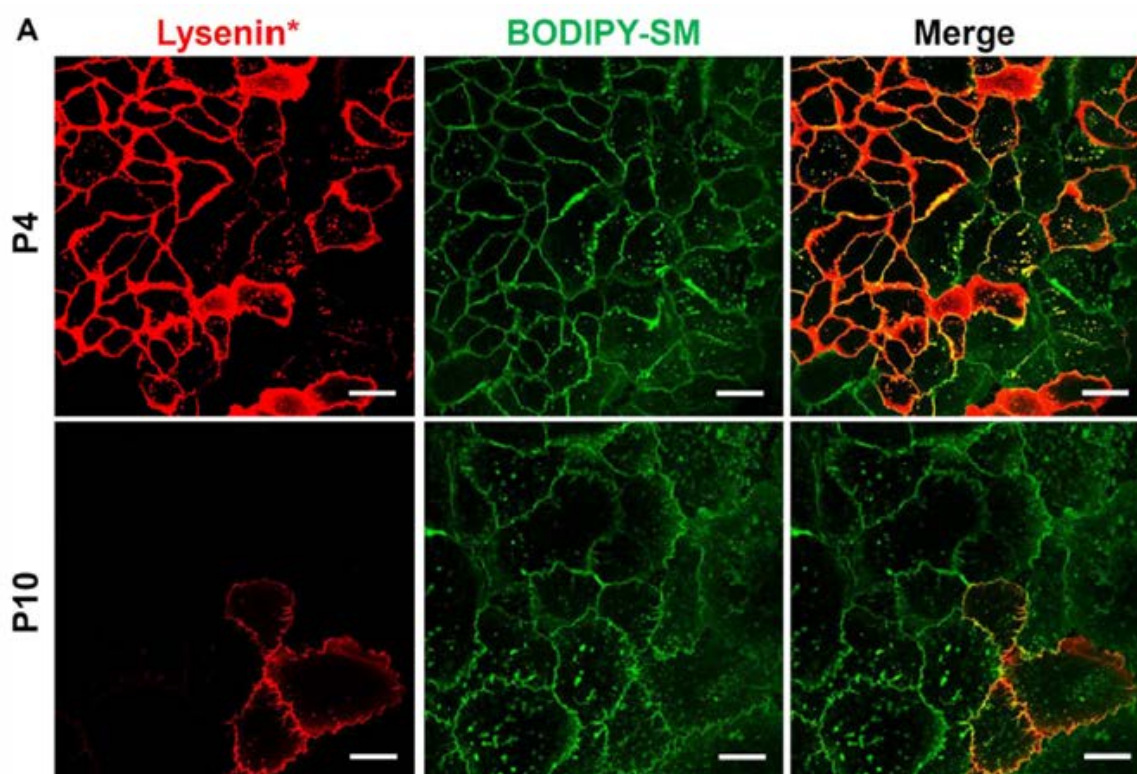
На база на проведените изследвания на влиянието на ROCK киназния инхибитор Y27632 върху пролиферативния капацитет на нормални и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити може да се заключи, че използването на този инхибитор води до избягване на навлизането на нормалните клетки в състояние на репликативен сенесценс, докато при имортализирани кератиноцити инхибирането на ROCK киназите чрез Y27632 не води до промени в пролиферативния капацитет на клетките. По отношение на сенесцентния маркер SA $\beta$ Gal, при нормалните кератиноцити, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632, процентното съдържание на положителните за този маркер клетки се запазваше под 20% за целия период на експеримента, докато при контролни, нетретирани кератиноцити, беше наблюдавано много по-бързо натрупване на SA $\beta$ Gal-позитивни клетки, което корелираше с намаления пролиферативен капацитет на клетките.

***Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс***

Изпълняването на бариерната функция на кожата изисква правилно поддържане на епидермалната хомеостаза, което включва пролиферация, миграция и диференциация на кератиноцитите, като подмяната на епидермалните клетки се забавя значително при възрастните индивиди [178, 179]. Възприемането на информация от заобикалящата среда и последващия адаптивен отговор на клетката се осъществява посредством плазмената мембрана на кератиноцитите, чрез активирането на сигнални рецептори или чрез адхезивни трансмембранни белтъци. Интересно е, че рецепторите и адхезивните белтъци се смята, че се локализируют в специализирани области на мембраната, където някои от тях се обединяват в платформи, контролиращи пролиферацията, диференциацията и миграцията на клетките. Предполага се, че именно тези платформи в клетъчната мембрана са отговорни за проявата на анормални фенотипи при човешки кератиноцити и промяната на функциите на епидермалната бариера [180, 181]. Поради това ние си поставихме за задача да установим дали в хода на настъпване на репликативен сенесценс не настъпват промени в липидните домени в плазмената мембрана на кератиноцитите и как това се отразява на функционалността на тези структури.

Подходите, използващи флуоресцентни проби като lysenin\*, theta\*, BODIPY-SM, за първи път са приложени успешно за визуализацията на субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на еритроцити. Експерименталните процедури се основават или на включване в мембраната на екзогенни липидни аналози като BODIPY-SM [182, 183] или на анализ на ендегенния сфингомиелин или холестерол с помощта на нетоксични фрагменти на lysenin [184] или theta токсин [185], които са придобили флуоресценция при фузия с mCherry и се означават съответно като lysenin\* и theta\*. Първоначално разработените методологии за визуализация на липидните домени чрез флуоресцентни маркери са създадени с помощта на еритроцитни мембрани, които за разлика от мембраната на кератиноцити, са гладки и лишени от нагъвания, и поради това са удобен модел за изучаването на мембранни домени. Впоследствие тези методики бяха адаптирани за кератиноцитни мембрани, при които фокусирането задължително трябва да бъде осъществено върху клетъчната мембрана, която е прикрепена към дъното на културалните съдове, тъй като в резултат на адхезията на клетката към дъното на съда се губят част от неравностите в мембраната.

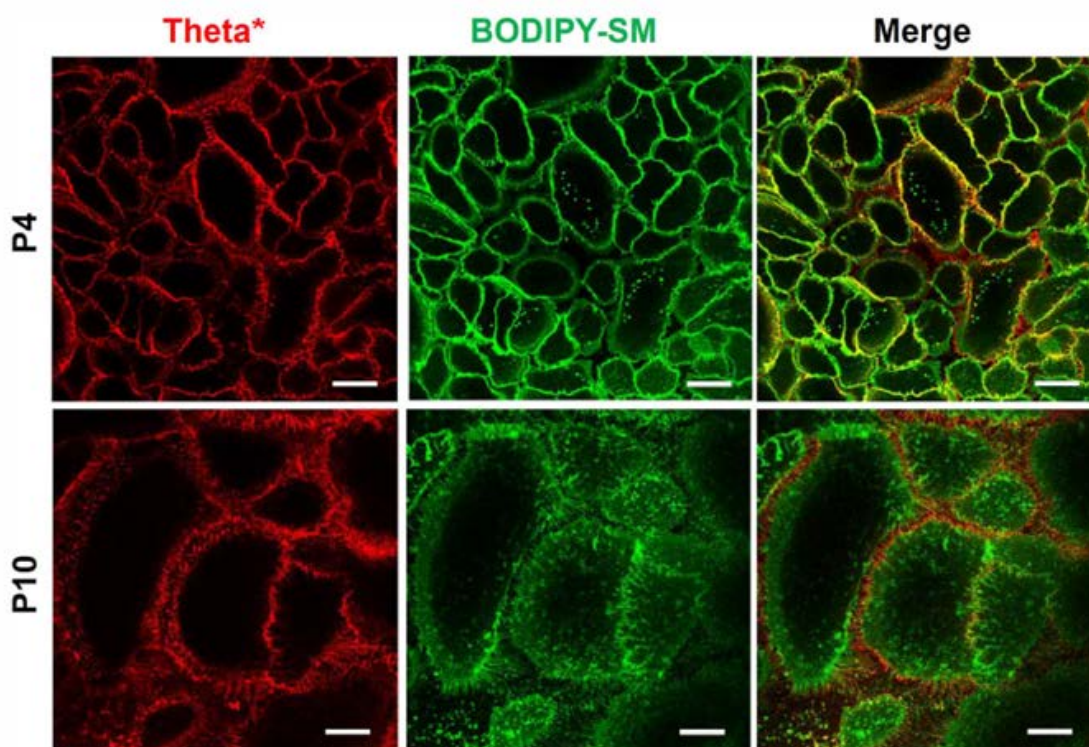
С цел определяне на функционалното значение на липидните субмикрометрични домени за процесите на клетъчно стареене, домени бяха визуализирани при нормални кератиноцити при нарастващо удвояване на клетъчната популация. Репликативен сенесценс беше предизвикван в кератиноцитната култура посредством поддържането ѝ като пролиферираща култура, като от изключелно значение беше пасажирването да се осъществи преди достигането на конfluентност на културата, за да се избегне необратимия арест и крайна диференциация на клетките, настъпващи при достигането на конfluентност [167].



**Фигура 7. Визуализация на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в клетъчната мембрана на нормални човешки кератиноцити.**

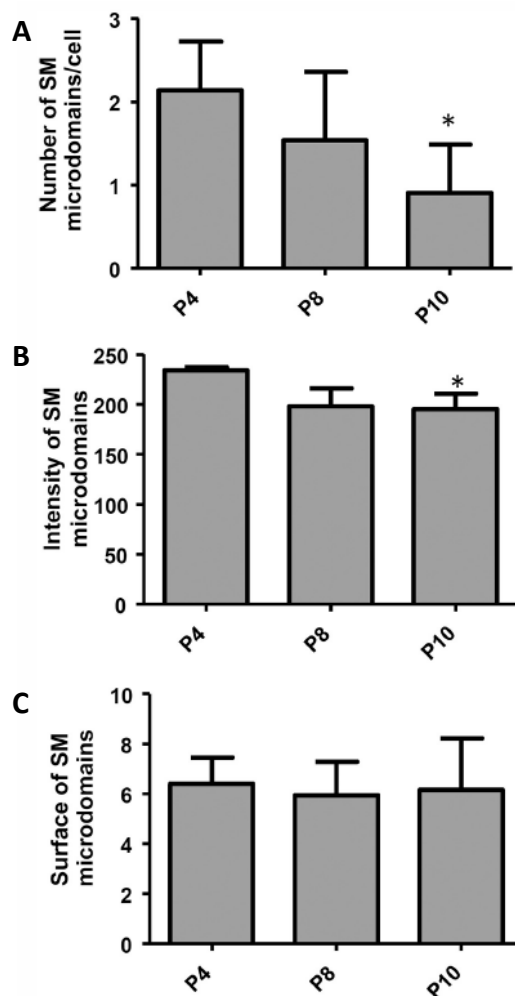
За визуализацията на богатите на сфингомиелин домени в плазмената мембрана беше използване маркиране на ендогенния сфингомиелин с lysenin\* и включване на екзогенен BODIPY-SM в мембраната (фигура 7). При ранни пасажи на културата (P4) беше установен значителен брой на домените, в които чрез lysenin\* се визуализираше ендогенния сфингомиелин, а също така и значителен брой области в мембраната, към които се привличаше екзогенния аналог на сфингомиелина BODIPY-SM. Но при маркирането на сенесцентни нормални кератиноцити (P10) броят на домените, визуализирани с lysenin\*, беше значително по-малък от наблюденията при ранни пасажи на културата. Интересното в случая е, че плазмената мембрана и по-точно специфични области в нея, запазваха способността си да привличат екзогенния сфингомиелин тъй като запазваха способността си да привличат BODIPY-SM. В допълнителни експерименти беше установено, че привличането на екзогенен сфингомиелин към тези липидни домени е чувствително към отстраняването на холестерола от мембраната, като беше установено, че отстраняването на холестерола посредством третиране с метил- $\beta$ -циклодекстрин (M $\beta$ CD) води до значителна загуба на домени, привличащи BODIPY-SM.

Друго интересно наблюдение беше, че при късните пасажи на културата, клетките запазващи маркирането на ендогенен сфингомиелин с lysenin\*, са онези с относително добре запазена морфология, т.е. пролифериращите кератиноцити останали в културата, докато клетките, показващи характерните за сенесценса морфологични черти, губеха богатите си на сфингомиелин домени, но запазваха способността си да привличат екзогенен BODIPY-SM.



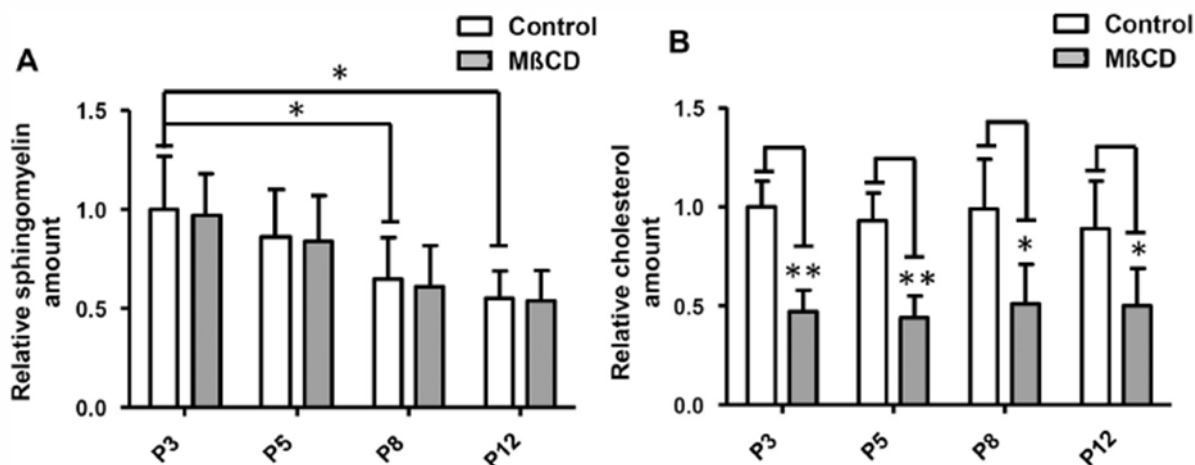
**Фигура 8. Визуализация на богатите на холестерол субмикрометрични липидни домени в клетъчната мембрана на нормални човешки кератиноцити.**

При визуализацията на богатите на холестерол субмикрометрични домени за маркиране на ендогенния холестерол беше използван *theta\**, като същевременно беше осъществено и маркиране с BODIPY-SM, за да се установи до каква степен се припокриват тези два типа липидни домени в мембраната на нормални човешки кератиноцити (*фигура 8*). За разлика от ендогенния сфингомиелин, ендогенния холестерол в мембраната се запазваше, като клетките, както от ранните (P4), така и от късните (P10) пасажи на културата запазваха в значителна степен богатите на холестерол субмикрометрични домени. Дори и при клетки с характерната за сенесцентни клетки морфология се запазваха богатите на холестерол домени, като значителна част от тях също така се ко-локализираха с домовете, привличащи екзогенния BODIPY-SM. Последното наблюдение допълнително потвърждава хипотезата ни, че привличането на екзогенен сфингомиелин (в случая аналога BODIPY-SM) към специфични области в плазмената мембрана се обуславя от присъствието и количеството на холестерола в мембраната. Запазването на богатите на холестерол субмикрометрични домени при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс също така предполага, че тези домени не са свързани с настъпващите морфологични и биохимични изменения в клетката, за разлика от богатите на сфингомиелин домени, които значително намаляват при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.



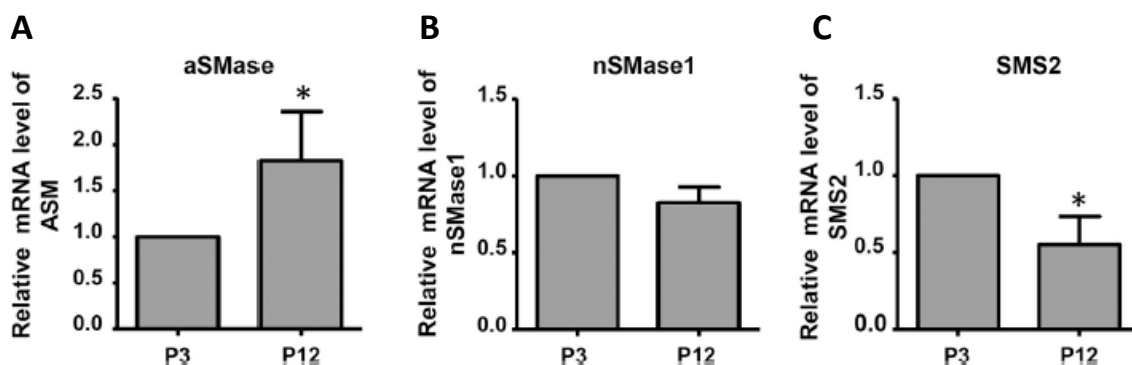
**Фигура 9. Брой и интензитет на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити.**

Посредством специална обработка на получените изображения за визуализация на богатите на сфингомиелин домени, чрез маркиране на ендегенния сфингомиелин с *lysenin\**, беше получена информация за относителния брой, интензитета и площта на тези липидни домени (фигура 9). По отношение на броя на домовете (фигура 9А), в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални кератиноцити беше установена загуба на домени, като същевременно намаляваше и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени (фигура 9В). Интересно е, че относителната площ на тези домени не се променяше в хода на настъпване на репликативен сенесценс (фигура 9С). Необходими са допълнителни експерименти, които да установят причините за запазването на площта на богатите на сфингомиелин домени, независимо от установената загуба на подобен тип липидни рафтове (на база на намаления им брой и интензитет).



**Фигура 10.** Относителни нива на сфингомиелин (A) и холестерол (B) при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.

С цел да се определи количественото съдържание на тоталния сфингомиелин и холестерол в мембраната беше осъществена екстракция на тоталното количество липиди, последвано от анализ на съдържанието на сфингомиелин и на холестерол чрез валидирани търговски китове. По отношение съдържанието на сфингомиелин се установи намаляване на съдържанието на сфингомиелин с напредването на културата, като премахването на холестерола от мембраната посредством третиране с MβCD не водеше до значителни изменения в количеството сфингомиелин (*фигура 10A*). Когато беше анализирано количественото съдържание на холестерол при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс не бяха установени значителни разлики между ранните (P3) и късните (P12) пасажи на културата, като относителното съдържание на холестерол се запазваше (*фигура 10B*). Дори при извличането на холестерола от мембраната, посредством третиране с MβCD, не бяха наблюдавани разлики в относителното му съдържание при клетките от различни пасажи.



**Фигура 11.** Нива на експресия (иРНК) на кисела сфингомиелиназа (aSMase) (A), неутрална сфингомиелиназа 1 (nSMase1) (B) и сфингомиелин синтаза 2 (SMS2) (C) при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.

Установеното намаляване на съдържанието на сфингомиелин в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити ни наведе на мисълта, че тази промяна може да се дължи или на намален синтез, или на повишено разграждане на този сфинголипид, или да е резултат и от двата процеса. Поради това беше осъществен количествен анализ на нивата на експресия на три ключови белтъка, свързани със синтеза и разграждането на сфингомиелин.

Първият изследван белтък беше киселата сфингомиелиназа (EC:3.1.4.12) (aSMase), катализираща хидролизата на сфингомиелина до церамид и фосфохолин. Този ензим представлява гликопротеин, който в клетката се локализира основно в лизозомите, но може и да се релокализира на повърхността на клетката при излагане на клетката на действието на различни стресори [186], като механизма на това изнасяне на aSMase остава неизяснен. Освен че действа при вътреклетъчното разграждане на сфингомиелин в лизозомите, aSMase изпълнява определени функции на клетъчната повърхност, включително и в реорганизацията на мембранните микродомени [187]. При нормалните човешки кератиноцити, при настъпването на репликативен сенесценс, се наблюдаваше повишаване на нивата на експресия на aSMase (*фигура 11A*), което индикира повишено разграждане на сфингомиелина, но същевременно може да води и до реорганизация на липидните домени в плазмената мембрана.

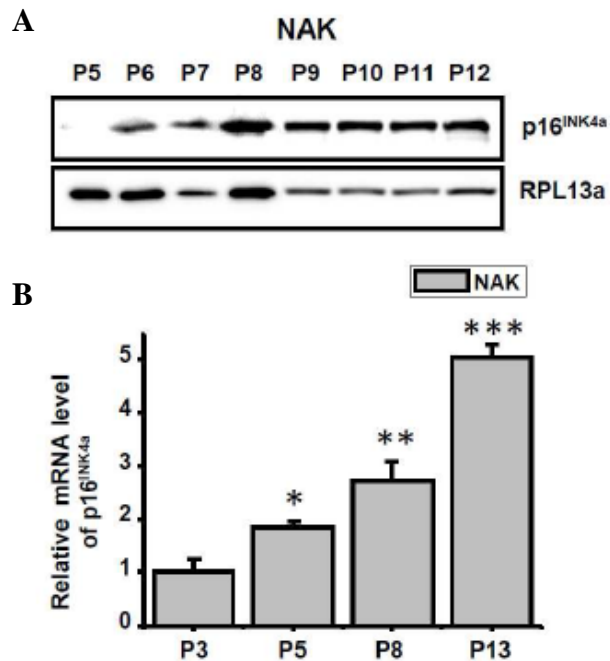
Вторият анализиран ензим беше неутрална сфингомиелиназа 1 (EC:3.1.4.12) (nSMase1), която също катализира разграждането на сфингомиелина до церамид и фосфохолин, но се различава по рН оптимума си от aSMase и по зависимостта си от магнезиеви йони за своята активност. Точната биологична роля на nSMase1 не е добре изяснена, но е известно че този ензим е свързан главно с отговора на клетката към различни стресори и последваща сигнална трансдукция [188, 189]. При анализа на нивата на експресия беше установено, че за разлика от aSMase, нивата на иРНК за nSMase1 се запазваха относително постоянни при човешки кератиноцити, в хода на настъпване на репликативен сенесценс (*фигура 11B*).

Третият белтък, чиято експресия беше анализирана, е сфингомиелин синтаза 2 (EC:2.7.8.27) (SMS2), която катализира получаването на сфингомиелин от церамид и фосфатидилхолин, като в тази реакция се получава и ДАГ. Този ензим в клетката е локализиран преобладаващо в плазмената мембрана [190] и участва главно в регулацията на хомеостазата на различни сигнални липиди и последващата сигнална трансдукция в клетката [191]. При настоящите експерименти, свързани със стареенето на нормални човешки кератиноцити, беше установено намаляване на нивата на експресия на SMS2 в хода на възникване на репликативен сенесценс (*фигура 11C*).

На база на получените резултати за експресията на тези три ключови ензими, свързани с метаболизма на сфингомиелин в клетката, може да бъде хипотезирано, че установеното намаляване на броя и на интензитета на богатите на сфингомиелин домени е възможно да се дължи както на усилено разграждане под действието на aSMase, така и да е резултат от намален синтез на сфингомиелин (поради намалената експресия на SMS2), или да е обусловено от цялостно изменение на хомеостазата на сфингомиелин в клетъчната мембрана. Поради свързаните с ремоделиране на мембраната ефекти на aSMase е възможно наблюдаваното запазване на относителната

площ на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени да се дължи на повишените нива на експресия на този ензим.

Необходими са допълнителни експерименти, които да изяснят как наблюдаваните промени в експресията на ключови ензими, свързани със синтеза и разграждането на сфингомиелин, корелират с наблюдаваните изменения в броя и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.



**Фигура 12.** Нива на експресия на сенесцентния маркер p16<sup>INK4a</sup> при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.

С цел да бъде допълнително потвърдено, че изследваните нормални човешки кератиноцити от късни пасаж (P8 и P13) наистина се навлезли в състояние на необратим арест в клетъчния цикъл и съответно репликативен сенесценс, посредством Western блот анализ и RT-qPCR бяха определени нивата на експресия на белтъка p16<sup>INK4a</sup>, който действа като инхибитор на циклин-зависимите кинази и е често използван сенесцентен биомаркер [192]. Нивата на експресия на p16<sup>INK4a</sup>, както на ниво белтъчно съдържание (*фигура 12A*), така и на ниво иРНК (*фигура 12B*) се повишаваха при навлизането на нормалните човешки кератиноцити в състояние на репликативен сенесценс, което допълнително потвърждава, че кератиноцитните култури от късен пасаж наистина се намираха в състояние на необратим арест в клетъчния цикъл.

На база на проведената анализи на структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в мембраната на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпването на репликативен сенесценс може да се заключи, че промените в липидния състав засягат количеството сфингомиелин и домените, които са обогатени с този липиден компонент на мембраната. Липсата на изменение както на количеството холестерол, така и в броя на обогатените на холестерол субмикрометрични домени в плазмената мембрана предполага, че функционалната

роля на тези домени при нормални кератиноцити не е свързана с настъпването на репликативен сенесценс, но това не изключва възможността тези домени да се променят при настъпването на други форми на клетъчно стареене.

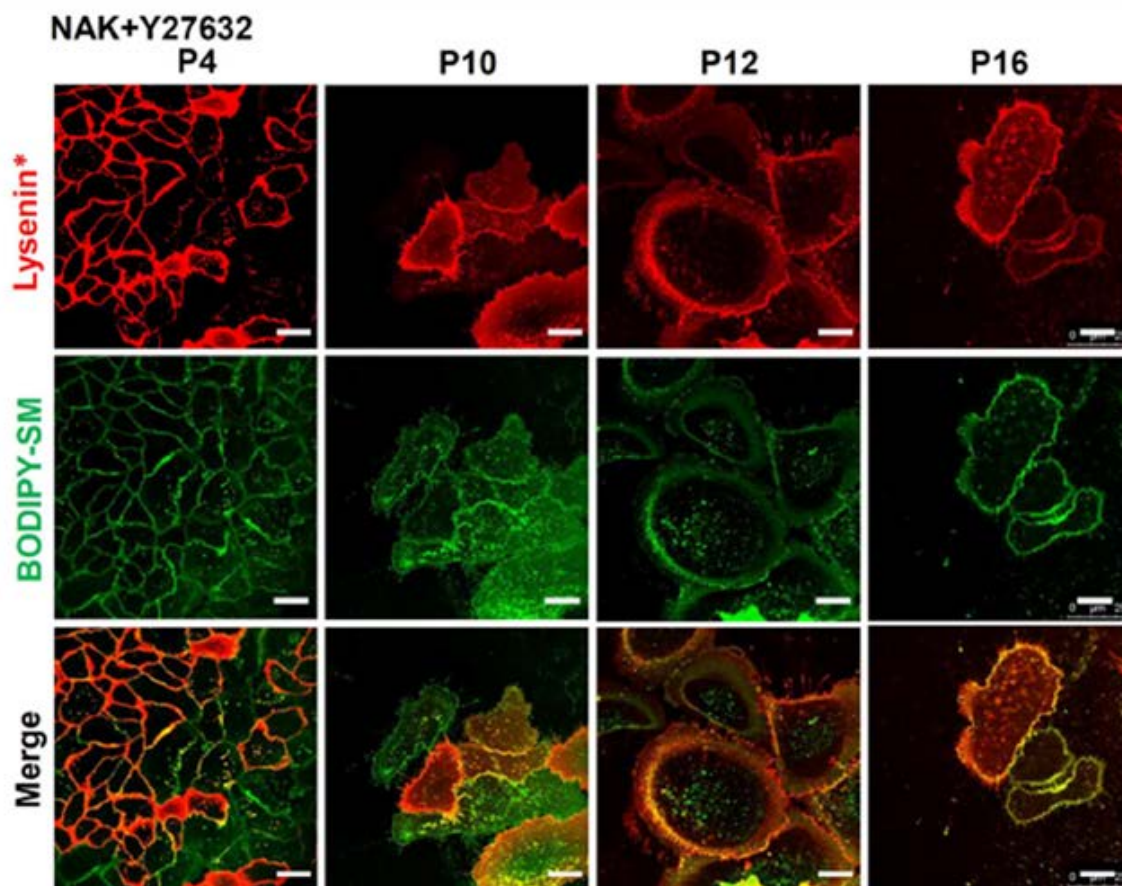
***Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, третирани с инхибитора Y27632, в хода на настъпване на репликативен сенесценс***

С цел да бъде установено дали предотвратяването на клетъчното стареене посредством ROCK киназния инхибитор Y27632 подпомага и запазването на структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на кератиноцитите, беше проведена визуализация на тези липидни структури с помощта на lysenin\* и BODIPY-SM (*фигура 13*).

Нормални човешки кератиноцити, отглеждани в присъствието на 10  $\mu$ M Y27632 бяха маркирани с lysenin\* (за ендогенния сфингомиелин) и BODIPY-SM (за екзогенния сфингомиелин) като беше използвана същата методология, използвана при визуализацията на субмикрометрични липидни домени при нормални, нетретирани кератиноцити. Визуализация на богатите на холестерол субмикрометрични домени не беше осъществена, поради получените резултати при нормални, нетретирани кератиноцити (*фигура 8*), при които тези домени се запазваха в хода на индукция на репликативен сенесценс.

При ранните пасажи (P4) на третирани с ROCK инхибитора Y27632 нормални кератиноцити се установиха значителен брой домени в плазмената мембрана, които се маркираха за ендогенен сфингомиелин (чрез lysenin\*) и привличаха екзогенния сфингомиелин (BODIPY-SM), като голяма част от тези домени също така се и припокриваха (*фигура 13, първа колона*). При по-късните пасажи на културата (P10 и P12) се наблюдаваше намаляване на броя на домовете в мембраната, привличащи екзогенния сфингомиелин (BODIPY-SM), а също така и на домовете, които се маркираха за ендогенен сфингомиелин чрез lysenin\* (*фигура 13, втора и трета колона*). Същевременно се наблюдаваше и значително припокриване между маркираните с lysenin\* и с BODIPY-SM субмикрометрични липидни домени.

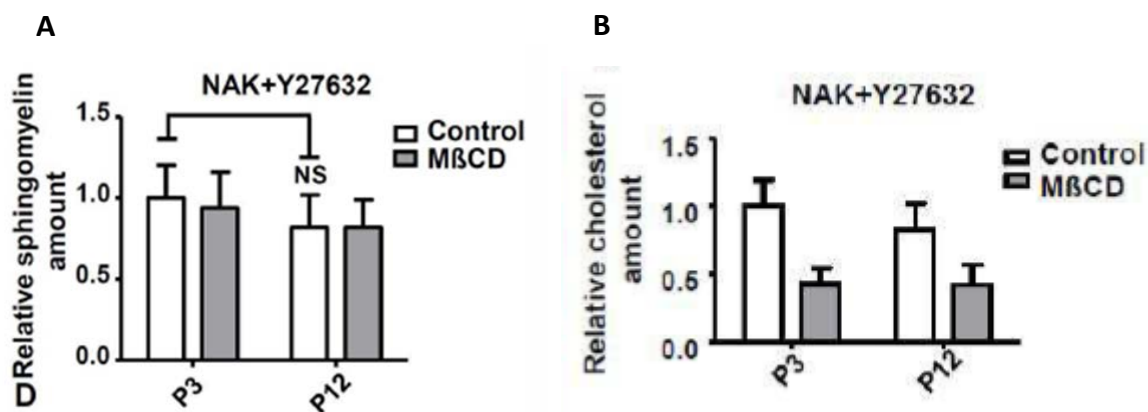
Когато визуализация беше проведена с клетки от много късен пасаж (P16) се наблюдаваха както липидни домени, които се маркираха с lysenin\*, а също така и домени, които привличаха екзогенния BODIPY-SM (*фигура 13, последна колона*). Подобно на по-ранните пасажи на третирани с ROCK инхибитора Y27632, маркираните с lysenin\* и BODIPY-SM субмикрометрични липидни домени отново показваха значителна степен на припокриване.



**Фигура 13.** Визуализация на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на нормални кератиноцити, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632.

Третирането на нормални човешки кератиноцити с инхибитора на ROCK киназите Y27632 водеше до запазване на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на кератиноцитите, визуализиращи се с помощта на lysenin\* (фигура 13, *Lysenin\**), като същевременно се запазваше и способността на определени домени в мембраната за привличане на екзогенен BODIPY-SM (фигура 13, *BODIPY-SM*). Значителната степен на припокриване между липидните домени (фигура 13, *Merge*), маркиращи се с lysenin\* и с BODIPY-SM, предполага запазване на функционалността на плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в резултат на третиране с ROCK киназния инхибитор Y27632.

Третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 води не само до запазване на пролиферативния потенциал на клетка и до избягване на настъпването на репликативен сенесценс, но същевременно подпомага и запазването на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана. Запазването на тези структури в плазмената мембрана вероятно е свързано и със запазване на способността за сигнална трансдукция през тях, но тази хипотеза е необходимо да бъде изследвана допълнително.



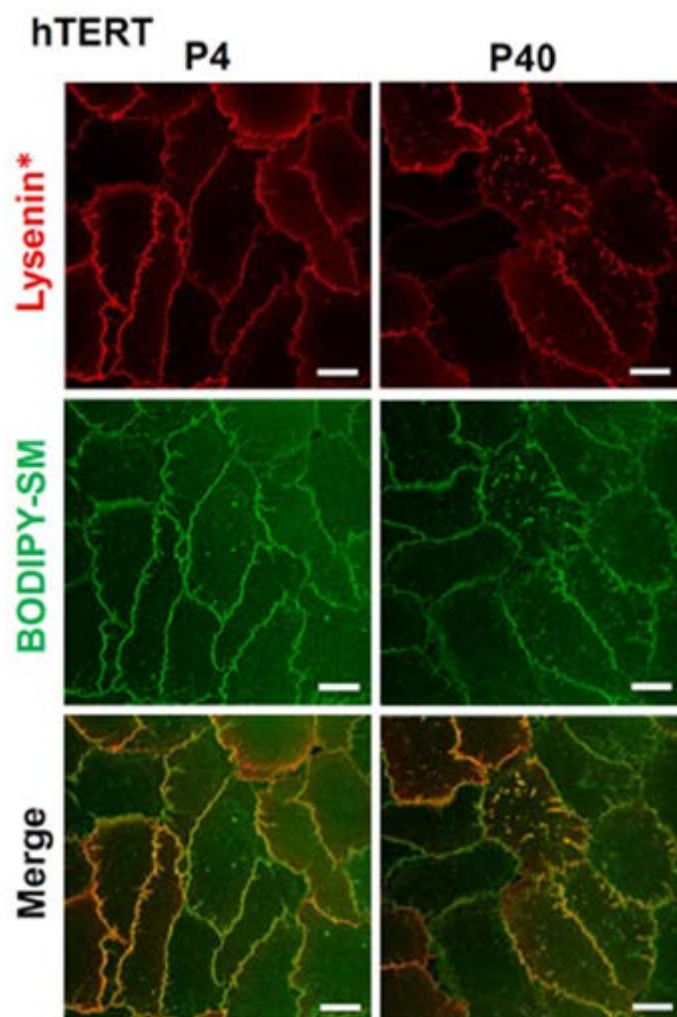
**Фигура 14.** Относителни нива на сфингомиелин (A) и на холестерол (B) при нормални човешки кератиноцити, третиран с инхибитора Y27632.

Допълнително беше проведен количествен анализ на съдържанието на сфингомиелин и на холестерол при нормални човешки кератиноцити, третиран с инхибитора Y27632. По отношение на съдържанието на сфингомиелин не беше установена статистически значима разлика между клетките от ранни пасажи (P3) и тези от късни пасажи (P12) на културата (*фигура 14A*), което предполага че третирането на нормални човешки кератиноцити с инхибитора Y27632 подпомага запазването на количеството сфингомиелин в клетката. По отношение на съдържанието на холестерол също не беше установена разлика между клетките от ранни (P3) и късни пасажи (P12) (*фигура 14B*), като дори и при извличане на холестерола от мембраната посредством третиране с MβCD не беше установена разлика в съдържанието на холестерол.

На база на получените резултати за състава и структурата на липидните домени при нормални кератиноцити, третиран с ROCK киназния инхибитор Y27632, може да се направи извода, че третирането на кератиноцитите с Y27632 не само предотвратява настъпването на репликативен сенесценс, но също така запазва структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на клетките.

#### ***Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани човешки кератиноцити***

С цел да бъде установено дали при hTERT-имортализирани човешки кератиноцити настъпват промени в богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени при продължително культивиране на клетките, беше осъществена визуализация на тези домени с Iysenin\* (ендогенен сфингомиелин) и BODIPY-SM (екзогенен сфингомиелин).

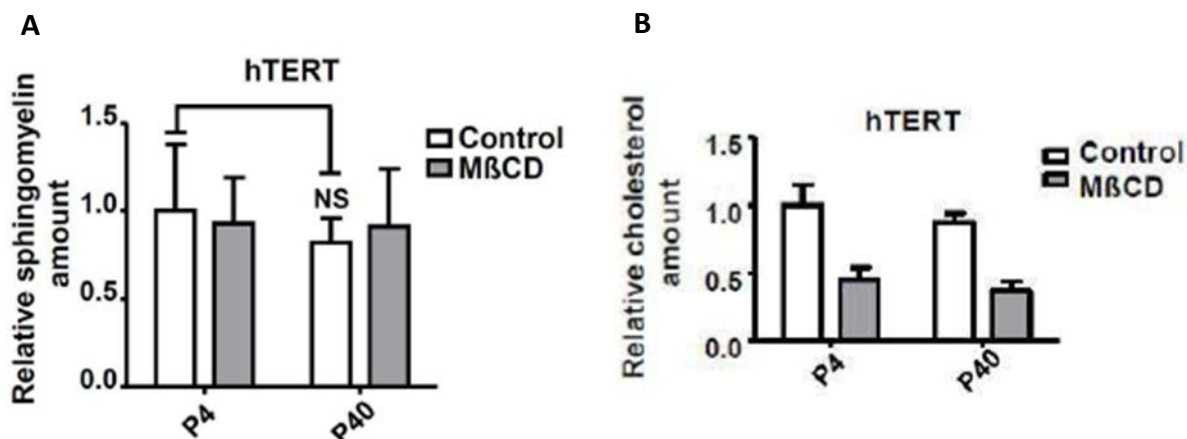


**Фигура 15.** Визуализация на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани кератиноцити.

При анализирането на ендогенния сфингомиелин чрез визуализация с lysenin\* беше установено, че при hTERT-имортализираните кератиноцити както от ранни (P4), така и от късни пасажи (P40) се запазва богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени (*фигура 15, Lysenin\**). Същевременно специфични области запазваха способността си да привличат екзогенния BODIPY-SM както при ранни пасажи (P4), така и при късни пасажи (P40) на културата (*фигура 15, BODIPY-SM*). Значителна част от наблюдаваните субмикрометрични липидни домени също така се припокриваха (*фигура 15, Merge*), което предполага запазване на функционалността на плазмената мембрана при hTERT-имортализираните човешки кератиноцити.

На база на тези резултати може да се заключи, че при hTERT-имортализираните човешки кератиноцити, неподатливи към настъпването на репликативен сенесценс, не се наблюдават изменения в структурата, броя и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени (на база на маркирането с lysenin\*), като се запазва и способността на мембраната да привлича екзогенен BODIPY-SM. Наблюдаваните различия между нормални, нетретираните кератиноцити и hTERT-имортализирани кератиноцити предполагат, че наблюдаваните промени вероятно се

дължат на настъпването на репликативен сенесценс при нормалните клетки и е възможно тези изменения да са както причина, така и следствие от клетъчното стареене.



**Фигура 16. Относителни нива на сфингомиелин (А) и на холестерол (В) при hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.**

За потвърждаване на резултатите от визуализацията на субмикрометричните липидни домени беше определено относителното количество на сфингомиелин и холестерол при hTERT-имортализирани кератиноцити от ранни и късни пасажи. По отношение съдържанието на сфингомиелин не беше установена статистически значима разлика между клетките от ранни (P4) и късни (P40) пасажи на културата, като екстракцията на холестерол чрез третиране с MβCD не доведе до промяна в относителното съдържание на сфингомиелин (*фигура 16A*). При количественият анализ на съдържанието на холестерол също не беше установена статистически значима разлика между hTERT-имортализирани кератиноцити от различни пасажи, както при контролни клетки, така и при екстракция на холестерола чрез третиране с MβCD (*фигура 16B*).

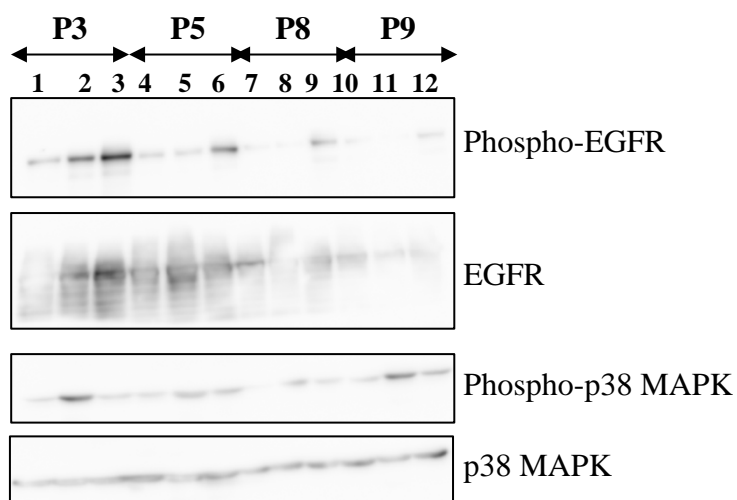
На база на данните за структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализираните кератиноцити може да заключим, че при продължително поддържане на клетките в условията на пролиферираща култура не настъпват промени в структурата на богатите на сфингомиелин домени, като същевременно се запазва и относителното съдържание на сфингомиелин и на холестерол на клетките. Наблюдаваните различия в структурата и състава на богатите на сфингомиелин домени между нормални и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити, предполагат, че дефекта в сенесцентната програма (т.е. в експресията на p16<sup>INK4a</sup>) при имортализираните клетки подпомага запазването на структурата и състава на липидните домени в плазмената мембрана, но са необходими допълнителни експерименти, които да изяснят точните механизми за това.

Наблюдаваното запазване на богатите на сфингомиелин липидни домени при hTERT-имортализирани човешки кератиноцити при продължително поддържане на културата в пролиферативно състояние не изключва възможността да настъпват

промени в други мембранни структури, включително и в такива с преобладаващо липидна природа, които обаче не бяха обект на изследване при настоящата дисертационна работа.

### **Western блот анализи**

За да бъде установено дали и как промените в субмикрометричните липидни домени в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити повлияват основни сигнални пътища в клетката беше проведен Western блот анализ на ключови компоненти на сигнални пътища, за които е известно от научната литература, че се повлияват от структурата и състава на клетъчната мембрана и/или участват в основните сигнални пътища в клетката, активиращи се от компоненти в плазмената мембрана.



**Фигура 17. Western блот анализ на EGFR и p38 MAPK при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.**

Легенда: 1,4,7,10 – контролни, нетретиранни клетки; 2,5,8,11 – клетки, третирани с MβCD (7.5 mM); 3,6,9,12 – клетки, третирани с EGF (10 ng/mL).

Рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR) представлява рецепторна тирозин киназа, сигнализицията през която стимулира клетъчния растеж, оцеляване и миграция. Различната локализация на белтъка, включително и в плазмената мембрана, води до модулирането на множество сигнални пътища, включително и на p38 MAPK сигналния път [193]. p38 MAPK е член на семейството на митоген-активирани серин/треонин протеин кинази (MAPK) и също е ключов регулаторен белтък в клетката, участващ в отговора на стресори и при възпалителните реакции, но също така действа и като регулатор на пролиферацията, диференциацията и оцеляването на определени клетъчни типове [194].

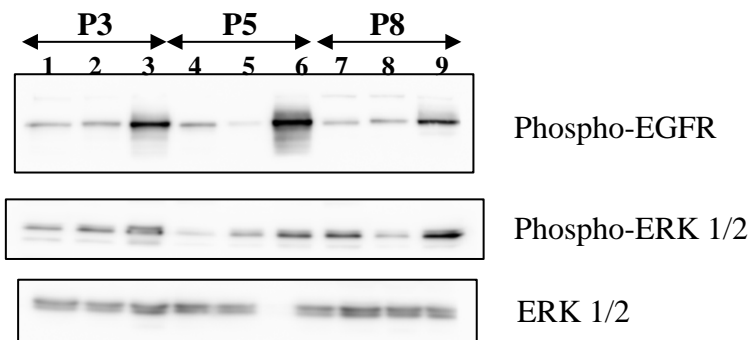
Посредством Western блот анализ при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс беше установено понижаване на нивата както на активната (фосфорилирана) форма на EGFR, така и на общото количество EGFR в клетката (фигура 17). Съгласно литературните данни, рецептора EGFR се асоциира с богатите на холестерол субмикрометрични липидни домени, поради което

количеството на ензима и неговата активност бяха определени и при третиране с М $\beta$ CD (*фигура 17, стартове 2,5,8,11*), като отново беше установена както загуба на активната форма на EGFR, така и на общото количество на белтъка в клетката. Количеството и активността на EGFR бяха определени и при стимулиране на рецептора с неговия лиганд EGF (10 ng/mL), като при настъпването на репликативен сенесценс (P8 и P9) отново беше наблюдавано намалено количество на активната форма на тази рецепторна тирозин киназа, а също така и силно понижаване на общото количество на ензима (*фигура 17, стартове 3,6,9,12*). Обобщено резултатите за активността и количеството на EGFR показват, че при нормални човешки кератиноцити при настъпването на репликативен сенесценс се наблюдава както загуба на активността на тази рецепторна тирозин киназа, така и на общото ѝ количество, независимо от запазването на богатите на холестерол субмикрометрични домени в плазмената мембрана на клетката, към които е известно от литературата, че се асоциира.

При анализът на активността и количеството на p38 MAPK посредством Western блот анализ беше установено, че в хода на настъпване на репликативен сенесценс количеството на активната (фосфорилирана) форма на тази серин/треонин киназа намалява, но дори и при човешки кератиноцити от късни пасажи (P8 и P9) количеството на активната форма беше достатъчно високо и тя беше успешно детектирана чрез Western блот (*фигура 17*). По отношение на общото количество на p38 MAPK беше установено незначително намаляване на относителното съдържание на този белтък в хода на настъпване на репликативен сенесценс. При екстракция на холестерола от мембраната чрез третиране с М $\beta$ CD се наблюдаваше повишаване на нивата на активната форма на p38 MAPK, но не и на общото количество на ензима (*фигура 17, стартове 2,5,8,11*), което предполага активация на този сигнален път при промени в структурата на клетъчната мембрана. Точният механизъм, отговорен за повишаването на активността на p38 MAPK при извличане на холестерола от мембраната, е неизяснен и неговото идентифициране изисква провеждането на допълнителни експерименти. При стимулация на кератиноцитите с епидермалния растежен фактор (10 ng/mL) не беше наблюдавана промяна както по отношение на активната форма, така и в общото количество на p38 MAPK (*фигура 17, стартове 3,6,9,12*). В обобщение, в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити се наблюдаваше намаляване на активността на p38 MAPK, но дори и при сенесцентни клетки успешно бе детектирана активната форма на ензима, макар и в изключително ниски нива. Същевременно в хода на настъпване на сенесценс беше установено и незначително снижаване на общото количество на тази протеин киназа.

Ако резултатите за EGFR и p38 MAPK бъдат разгледани съвместно може да се заключи, че при настъпването на репликативен сенесценс се загубва активността и на двата ензима, като при сенесцентни кератиноцити на практика не се детектираше активната форма на EGFR, освен при стимулиране на клетките със съответния лиганд (EGF), докато нивата на активната форма на p38 MAPK се запазваха относително високи, но е спорно доколко запазената активност на тази протеин киназа е достатъчна за осъществяването на нормалните физиологични функции, свързани с този ензим.

Освен загуба на активност по отношение на EGFR беше установено намаляване на общото количество на тази тирозин киназа, което е възможно да се дължи както на намален синтез или на усилено разграждане на самия белтък, но са необходими допълнителни експерименти, които да установят точната причина. Общото количество на p38 MAPK също беше понижено, но намаляването на нивата на тази протеин киназа не беше статистически значимо.



**Фигура 18. Western блот анализ на EGFR и ERK1/2 при нормални човешки кератиноцити, третиран с ROCK киназния инхибитор Y27632.**

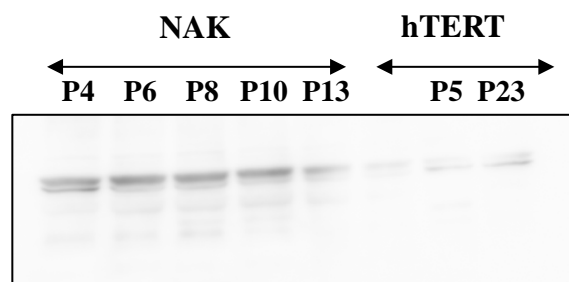
Легенда: 1,4,7 – контролни, нетретиранни клетки; 2,5,8,11 – клетки, третиран с MβCD (7.5 mM); 3,6,9,12 – клетки, третиран с EGF (10 ng/mL).

Предвид загубата на експресия и на активност на EGFR, наблюдавани в хода на настъпване на сенесценс при нормални кератиноцити, нивата и активността на тази рецепторна тирозин киназа бяха изследвани и при нормални човешки кератиноцити, третиран с ROCK киназния инхибитор Y27632. При Western блот анализа на третиран с Y27632 нормални кератиноцити от възрастен индивид беше установено запазване в значителна степен на нивата на активната форма на EGFR (*фигура 18*), а също така и на тоталното количество на този белтък (данните не са представени). Същевременно при екстракцията на холестерола от мембраната чрез третиране с MβCD не се наблюдаваше статистическо значимо снижаване на нивата на активната форма на EGFR (*фигура 18, стартове 2,5,8*), а при стимулиране на рецептора с неговия лиганд EGF се наблюдаваше активация, като при късните пасаж на третираните с инхибитора Y27632 кератиноцити нивата на активната форма на EGFR (*фигура 18, стартове 3,6,9*) бяха съизмерими с наблюдаваните при ранни пасаж на нетретиранни кератиноцити (*фигура 17, стартове 3,6,9,12*). Това наблюдение предполага, че функционалността на рецепторната тирозин кинази EGFR при третиране с ROCK инхибитора Y27632 (и съответно репресия на репликативния сенесценс) се запазва, което вероятно способства за запазването на пролиферативния капацитет на клетките.

Освен EGFR бяха изследвани и активността и количеството на MAP киназата ERK 1/2, известна и като p44/p42 MAPK, която подобно на p38 MAPK играе важна роля в редица сигнално-трансдукционни пътища в клетката. ERK1 и ERK2 представляват силно консервативни серин/треонин кинази, част от Ras-Raf-MEK-ERK сигналната каскада, която участва в регулацията на разнообразни процеси в клетката, включително в клетъчната адхезия, прогресията на клетъчния цикъл, клетъчната миграция, оцеляване, диференциация, метаболизъм и транскрипция [195]. Поради високата степен

на хомоложност между двата ензима (84% идентична белтъчна секвенция) и припокриването на биологичните им функции [196], нивата на активност и количеството на тези MAPK кинази бяха определени с помощта на антитела, които разпознават и двете изоформи. При третиране с ROCK инхибитора Y27632 нормални кератиноцити бяха установени сходни нива на експресия на активната форма на ERK1/2 при клетки от ранни (P3) и късни (P8) пасажи (*фигура 18*), като отстраняването на холестерола от мембраната чрез третиране с M $\beta$ CD не водеше до промяна в нивата на активната форма и в общото количество на тези два киназни ензима (*фигура 18, стартове 2,5,8*). При третиране на клетките с EGF се наблюдаваше минимално, но статистически незначимо, повижаване на нивата на активната форма на ERK1/2, но не и на общото количество на ензима (*фигура 18, стартове 3,6,9*). На база на тези резултати може да се заключи, че третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 не води до промяна в активността и нивата на ERK1/2, което предполага запазване и на предаването на сигнала през този сигнално-трансдукционен път.

На база на тези изследвания може да се заключи, че в хода на настъпване на клетъчен сенесценс настъпват промени не само в организацията на плазмената мембрана, но и при сигнализацията, опосредствана от специфични домени в нея. При третирането на нормалните човешки кератиноцити с ROCK киназния инхибитор Y27632 се наблюдава запазване както на активността, така и на количеството на някои от регулаторните белтъци, асоцииращи се с плазмената мембрана или участващи в сигнални каскади, които се медиират от мембранни компоненти. Поради относително малкият набор от сигнални белтъци, които са били анализирани при реализирането на настоящата дисертация, за да бъдат по-детайлно изяснени последствията както от клетъчното стареене, така и от възпрепятстването на този процес чрез специфични химични агенти, е необходимо провеждането на по-мощни изследвания, които да комбинират класически подходи за изучаване на сигналната трансдукция в клетката с достиженията на –омикс технологиите.



**Фигура 19. Western блот анализ на p16<sup>INK4a</sup> при нормални човешки кератиноцити, третиране с ROCK киназния инхибитор Y27632, и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.**

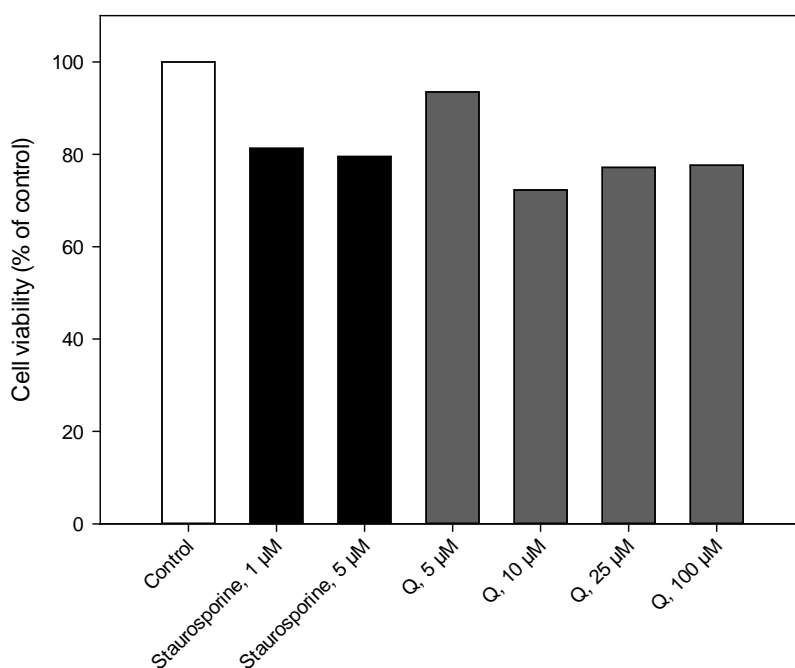
С цел да се потвърди, че наистина третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK киназния инхибитор Y27632 води до избягване на клетъчното стареене, бяха анализирани нивата на експресия на сенесцентния маркер p16<sup>INK4a</sup> при нормални клетки, третиране с този инхибитор (*фигура 19*). Както се и очакваше не беше наблюдавано повишаване на експресията на този сенесцентен маркер при

продължителното култивиране на клетките, като дори при късните пасажи експресията на белтъка се запазваше относително постоянна и сравнима с нивата при ранни пасажи на културата. При hTERT-имортилизираните кератиноцити, които са неспособни да навлязат в състояние на клетъчен сенесценс, не беше установена експресия на p16<sup>INK4a</sup>, което съответства и на информацията в научната литература.

На база на последните анализи може да се заключи, че третирането с инхибитора Y27632 води до запазване на нивата на експресия на инхибитора на циклин-зависимите кинази p16<sup>INK4a</sup> при продължително култивиране на клетките, което е в съответствие с наблюдаваното избягване на клетъчното стареене.

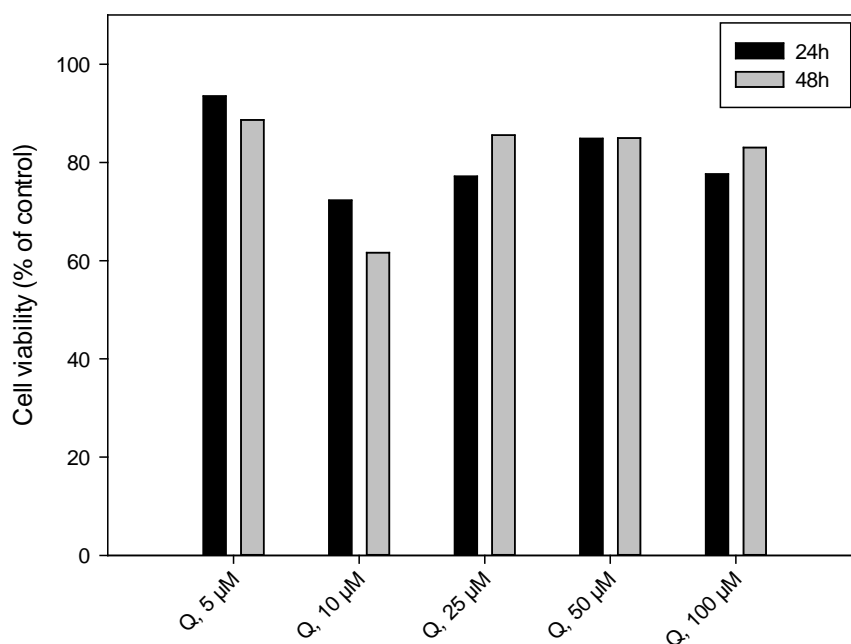
### ***Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки кератиноцити***

За голям брой биологично активни молекули има данни в научната литература, че са способни да повлияват различни регулаторни и сигнални пътища в клетката, които имат отношение към процесите на клетъчна смърт и клетъчно стареене [197]. Значителна част от тези молекули спадат към групата на природните флавоноиди, голяма част от които се определят и като антиоксиданти. Кверцитинът и дихидрокверцитинът представляват два структурно свързани представители на класа на флавоноидите, като за кверцитина е известно, че може да повлиява редица вътреклетъчни процеси, включително и някои процеси на програмирана клетъчна смърт [198]. Наличната информация относно биологичните ефекти на дихидрокверцитина е силно ограничена и се свежда основно до ефектите му върху сърдечно-съдовата система при моделни организми и при човека [199]. Поради тези причини ние си поставихме за цел да установим ефектите от третиране с тези два антиоксиданта върху преживяемостта и морфологията на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид с идеята тези съединения да бъдат приложени и при експерименти, включващи модулиране на клетъчното стареене.



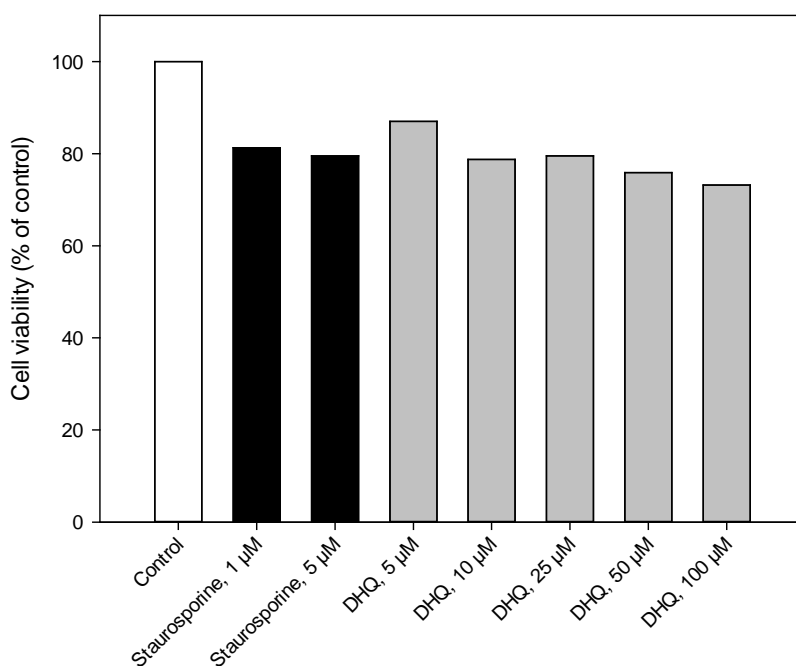
**Фигура 20. Клетъчна преживяемост (МТТ тест) на нормални човешки кератиноцити, третиран с нарастваща концентрация на кверцитин (Q) в продължение на 24 часа.**

При третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин (*фигура 20*) беше установено известно намаляване на клетъчната преживяемост, като най-силен инхибиторен ефект беше установен при концентрация 10 µM, но дори и при нея преживяемостта на културата беше над 50% при продължителност на третирането от 24 часа. Най-слабо изразен инхибиторен ефект беше установен при третиране на клетките с 5 µM кверцитин, като при това третиране преживяемостта на клетките е близка до установената за контролни, нетретиранни кератиноцити. С цел индукция на апоптоза, нормални човешки кератиноцити бяха третиран с стауроспорин, който представлява неселективен инхибитор на протеин киназите и е добре известен от литературата индуктор на ПКС [200]. При третирането на клетките със стауроспорин беше установено понижаване на клетъчната преживяемост, като е интересно наблюдението, че третирането на кератиноцити с 10 µM кверцитин водеше до по-силен инхибиторен ефект от третиране със 5 µM стауроспорин при продължителност на третирането от 24 часа. При по-продължително третиране на клетките със стауроспорин беше установено засилване на инхибиторния ефект, което водеше до значително намаляване на преживяемостта на културата.



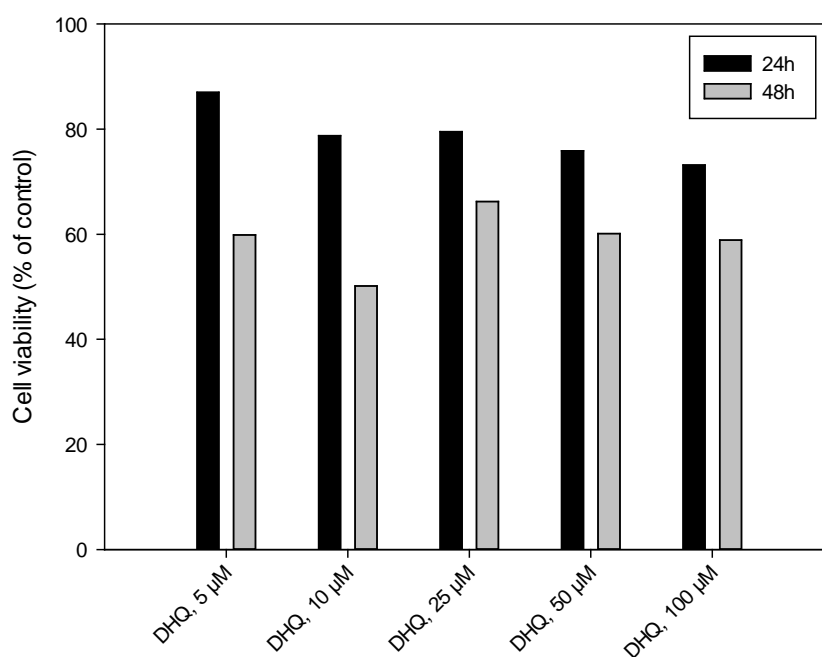
**Фигура 21. Клетъчна преживяемост на нормални човешки кератиноцити, третирани с нарастваща концентрация на кверцитин (Q), при различна продължителност на третирането (24 и 48 часа).**

При увеличаването на продължителността на третирането до 48 часа, при ниски концентрации на кверцитина (съответно 5 μM и 10 μM) беше наблюдаван по-силно изразен инхибиторен ефект в сравнение с третирането с продължителност 24 часа (фигура 21). Изненадващо, при по-високи концентрации (съответно 25 μM и 100 μM) беше установена по-висока преживяемост на нормалните кератиноцити при по-продължително третиране, докато при третиране на клетките с 50 μM кверцитин не беше установена разлика в преживяемостта при различните периоди на третиране. Наблюдаваното повишаване на клетъчната преживяемост при третиране с високи концентрации на кверцитин (25 μM и 100 μM) може да се дължи на селекция в резултат на третирането на клетки с по-висок пролиферативен потенциал, като същевременно кверцитина води до загуба на клетките с по-нисък пролиферативен потенциал, като тези различия в пролиферативния потенциал могат да бъдат обяснени с хетерогенната природа на изолираните първични кератиноцитни култури, използвани при реализирането на дисертацията.



**Фигура 22. Клетъчна преживяемост (MTT тест) на нормални човешки кератиноцити, третирани с нарастваща концентрация на дихидрокверцитин (DHQ) в продължение на 24 часа.**

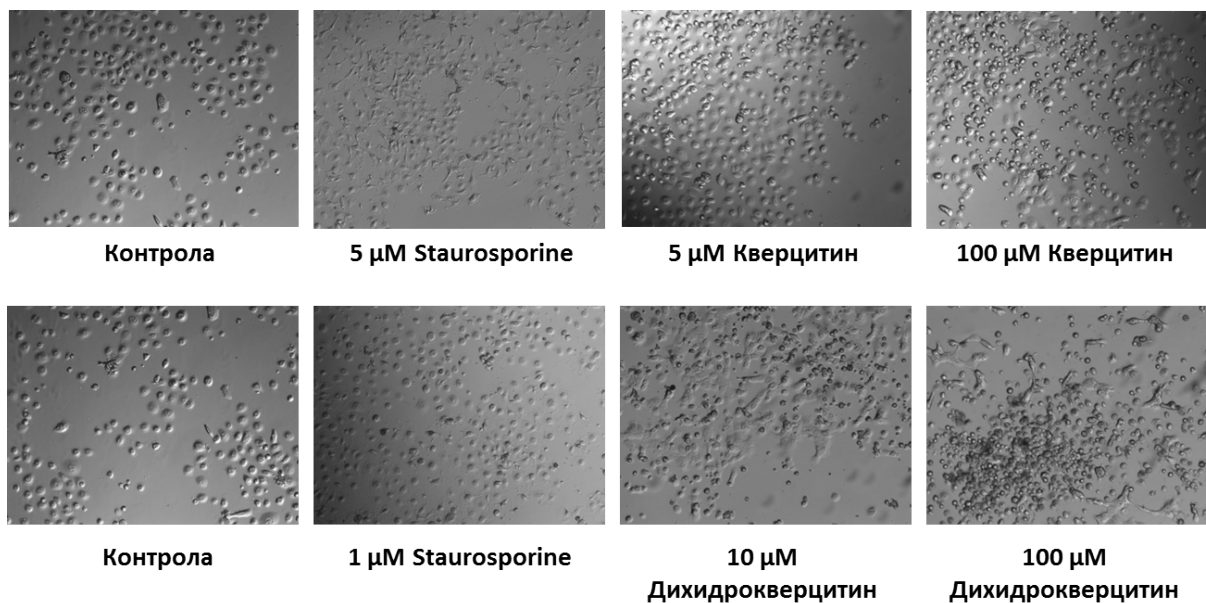
Беше проведен и аналогичен експеримент, при който нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид бяха третирани с нарастващи концентрации на дихидрокверцитин (*фигура 22*). При третиране на клетките в продължение на 24 часа, най-силен инхибиторен ефект беше установен при концентрация 100 µM дихидрокверцитин, докато най-слабо изразен беше инхибиторния ефект върху клетъчната преживяемост при концентрация 5 µM. В изследваната концентрационна област също така беше установена и дозова зависимост, като при нарастването на концентрацията на дихидрокверцитин се засилваше и инхибиторния ефект върху клетъчната преживяемост, но дори и при най-високата използвана концентрация (100 µM) клетъчната преживяемост е над 50% от тази на контролните, нетретирани клетки.



**Фигура 23. Клетъчна преживяемост на нормални човешки кератиноцити, третирани с нарастваща концентрация на дихидрокверцитин (DHQ), при различна продължителност на третирането (24 и 48 часа).**

При увеличаване на продължителността на третирането от 24 на 48 часа, беше установено засилване на инхибиторния ефект при всички тествани концентрации на дихидрокверцитина, като най-силно изразен инхибиторен ефект при по-продължителното третиране беше наблюдаван при 10 µM дихидрокверцитин, а най-слабо изразен антипролиферативен ефект беше установен при 25 µM дихидрокверцитин (*фигура 23*). При по-продължителното третиране на нормални кератиноцити с дихидрокверцитин се губеше и концентрационната зависимост, проявяваща се при третиране в продължение на 24 часа. Вероятна причина за това е отново хетерогенната природа на използваните първични кератиноцитни култури.

С цел да се установи на какво се дължат наблюдаваните различия по отношение преживяемостта на нормални човешки кератиноцити третирани с едни и същи концентрации на кверцитин и дихидрокверцитин, но при различна продължителност на третирането беше проведен анализ на клетъчната морфология посредством светлинна микроскопия. Целта на този анализ беше да се установят на макроскопично ниво промените в клетъчната морфология и да се предположи какъв е подлежащия механизъм за подтискане на клетъчната преживяемост.



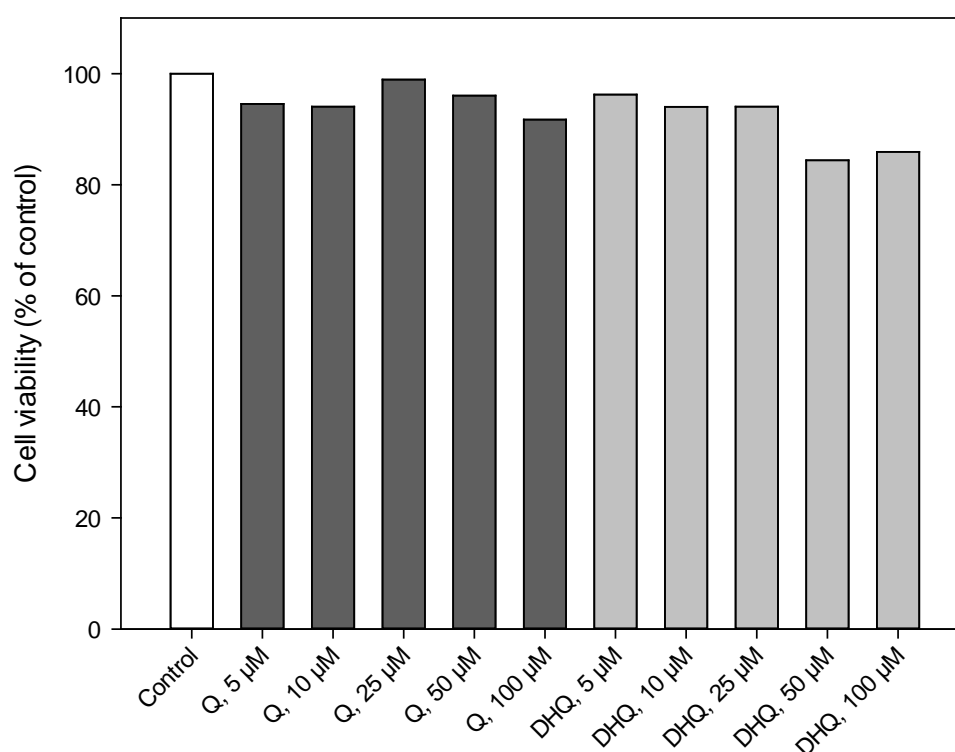
**Фигура 24.** Ефекти на кверцитин и дихидрокверцитин върху морфологията на нормални човешки кератиноцити, третиранни в продължение на 48 часа.

Когато беше анализирана клетъчната морфология при третиране в продължение на 48 часа с 5  $\mu\text{M}$  кверцитин, за който бе установено, че проявява най-слаб инхибиторен ефект (*фигура 21*), беше установено, че третираните кератиноцити до голяма степен запазват морфологията си, като незначителна част от клетките се окръгляха и отлепаха от дъното на културалния съд, което предполага индукция на апоптотичен тип клетъчна смърт при тези клетки (*фигура 24*). При третирането със 100  $\mu\text{M}$  кверцитин, за който беше установен по-силен инхибиторен ефект (*фигура 21*), по-голямата част от клетките се окръгляха и отлепаха от дъното на културалните съдове (индикиращо индукция на апоптотична клетъчна смърт), като същевременно клетките, оставащи прикрепени към дъното на съда, увеличаваха значително размерите си и изменяха морфологията си, като загубваха и характерната за кератиноцити призматична форма (*фигура 24*). Наблюдаваните промени в клетъчната морфология обаче не съответстват на настъпващите при третиране с неселективния протеин киназен инхибитор стауроспорин, които са характерни за индукция на класическия път на апоптоза. На база на това наблюдение може да се заключи, че третирането на нормални кератиноцити с кверцитин води до понижаване на клетъчната преживяемост и промени в клетъчната морфология, нехарактерни за класическия апоптотичен път на ПКС.

При третирането на клетките с 10  $\mu\text{M}$  дихидрокверцитин, който проявяваше най-силен инхибиторен ефект при продължителност на третирането от 48 часа (*фигура 23*), също беше наблюдавано окръгляне и отлепяне на част от клетките от дъното на културалните съдове (индикиращо индукция на апоптотичен тип клетъчна смърт), а останалите прикрепени към дъното на съда клетки изменяха морфологията си, подобно на клетките третиранни с 100  $\mu\text{M}$  кверцитин. При третирането на нормални кератиноцити с най-високата използвана концентрация на дихидрокверцитин (100  $\mu\text{M}$ ) морфологичните изменения бяха още по-силно изразени, като само малък процент от общото количество клетки оставаха прикрепени към дъното на съда. При третиране с

100  $\mu\text{M}$  дихидрокверцитин по-голямата част от клетките бяха със сферична форма и незакрепени за дъното на културалните съдове, което индикира индукция на по-скоро апоптотичен клетъчен тип. Подобно на третирането с кверцитин, третирането на нормални човешки кератиноцити с дихидрокверцитин също водеше до нехарактерни за апоптозата морфологични изменения.

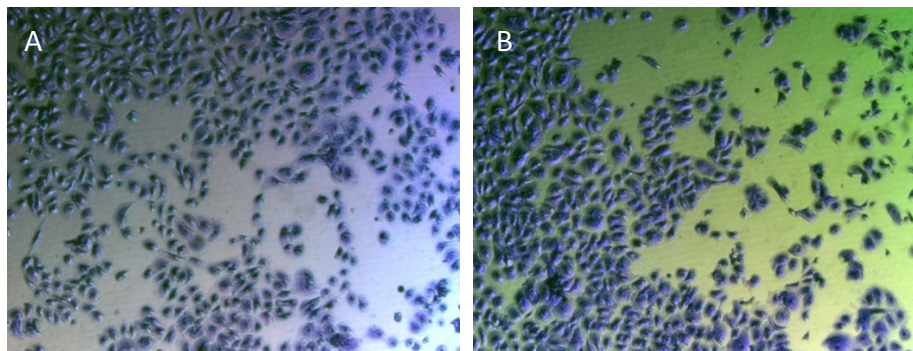
Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин води както до понижаване на клетъчната преживяемост, така и до значителни изменения в клетъчната морфология, които обаче не съответстват на наблюдаваните при индукция на класическия апоптотичен път посредством неселективния киназен инхибитор стауроспорин. Поради разнообразието по отношение на пътищата, водещи до клетъчна смърт и частичното припокриване между отделни регулаторни пътища [14], е необходимо провеждането на допълнителни експерименти, които да изяснят молекулния механизъм водещ до наблюдаваните морфологични изменения. Провеждането на тези допълнителни експерименти изисква и задълбочено изследване на научната литература, свързана с механизмите на клетъчна смърт, и подбор на най-подходящия набор от биомаркери, който да позволи правилната интерпретация на резултатите.



**Фигура 25.** Клетъчна преживяемост (оцветяване с Crystal Violet) на нормални човешки кератиноцити, третирани с нарастващи концентрации на кверцитин (Q) и дихидрокверцитин (DHQ) в продължение на 24 часа.

С цел да бъдат потвърдени резултатите за клетъчната преживяемост, получени посредством класическия МТТ тест, беше осъществено оцветяване на нормалните

кератиноцити, третирани с кверцитин и дихидрокверцитин, с Crystal Violet (*фигура 25*), като този метод представлява алтернативен метод за определяне на клетъчната преживяемост. При проведените изследвания беше установено минимално снижаване на клетъчната преживяемост (под 20% намаление при всички използвани третирания), като резултатите не корелираха с получените чрез класическия МТТ тест (*фигура 20 и фигура 22*).



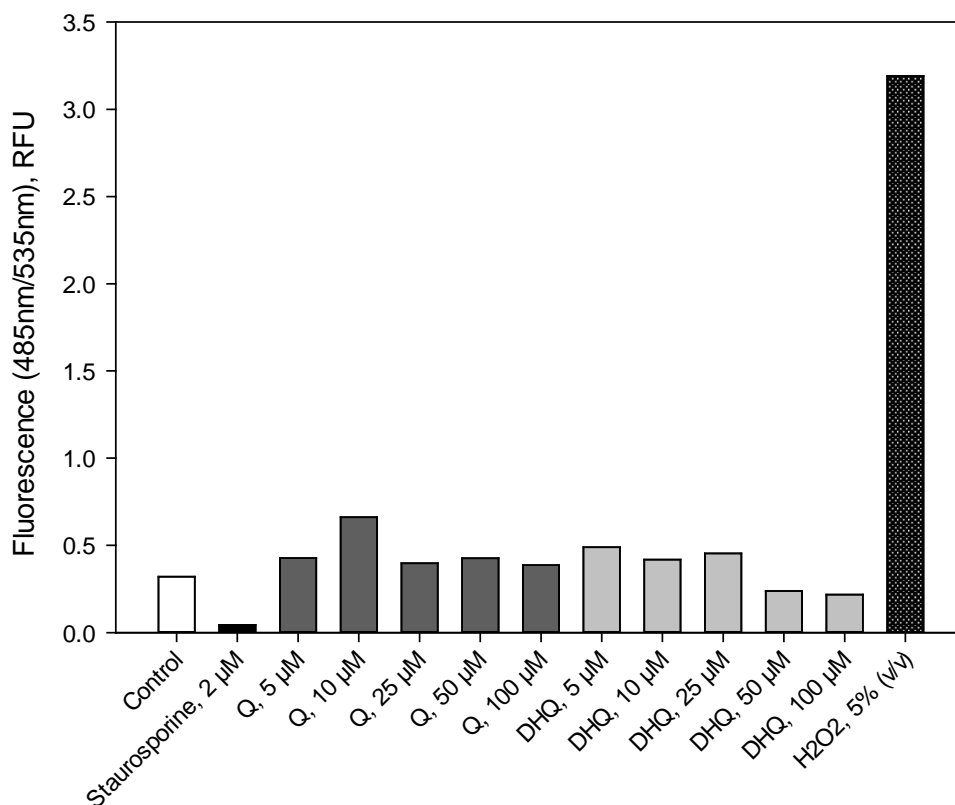
**Фигура 26.** Оцветяване на контролни клетки (А) и клетки, третирани с 5  $\mu\text{M}$  кверцитин (В) с Crystal Violet (0.5% в 20% метанол).

В опит да се обясни това несъответствие на резултатите от двата теста за клетъчна преживяемост, клетки, оцветени с Crystal Violet бяха наблюдавани чрез светлинна микроскопия (*фигура 26*). Беше установено, че багрилото е способно да навлиза не само в „живите клетки“, но също така и в клетъчни фрагменти и други артефакти от „мъртвите клетки“, които оставаха прикрепени към дъното на съда независимо от трикратното промиване преди оцветяването на клетките с Crystal Violet, което има за цел именно елиминирането на мъртвите клетки, присъстващи в клетъчната култура. Този недостатък на използваната методология я направи неприложима при използваната моделна система, тъй като при това оцветяване бяха детектирани не само останалите живи клетки, но също така и клетъчни фрагменти и артефакти от мъртвите клетки. Именно този важен недостатък прави оцветяването с Crystal Violet неподходяща алтернатива на МТТ теста при определянето на клетъчната преживяемост на нормални кератиноцити при третиране с антиоксидантни съединения, но метода е подходящ за изследвания, целящи изследване на промените в клетъчната морфология.

### ***Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху генерирането на свободни радикали (ROS) при нормални човешки кератиноцити***

Наблюдаваните изменения в клетъчната морфология, дължащи се на третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин, е възможно да се дължат на промени в редокс-статуса на клетката и генерирането на свободни кислородни радикали (ROS). С цел да се установят ефектите от третирането върху нивата на свободни кислородни радикали, беше използвано оцветяване на клетките с дихлорофлуоресцеин диацетат (DCFDA). DCFDA представлява нефлуоресцентна молекула, способна да преминава безпрепятствено през плазмената мембрана и да се превръща в клетката в дихлорофлуоресцеин (DCF), който е силно

флуоресцентен. Превръщането на DCFDA в DCF става под действието на митохондриални ензими, които присъстват и са активни единствено при живи клетки, така че получените данни за нива на ROS се отнасят само за живите клетки, присъстващи в културата.

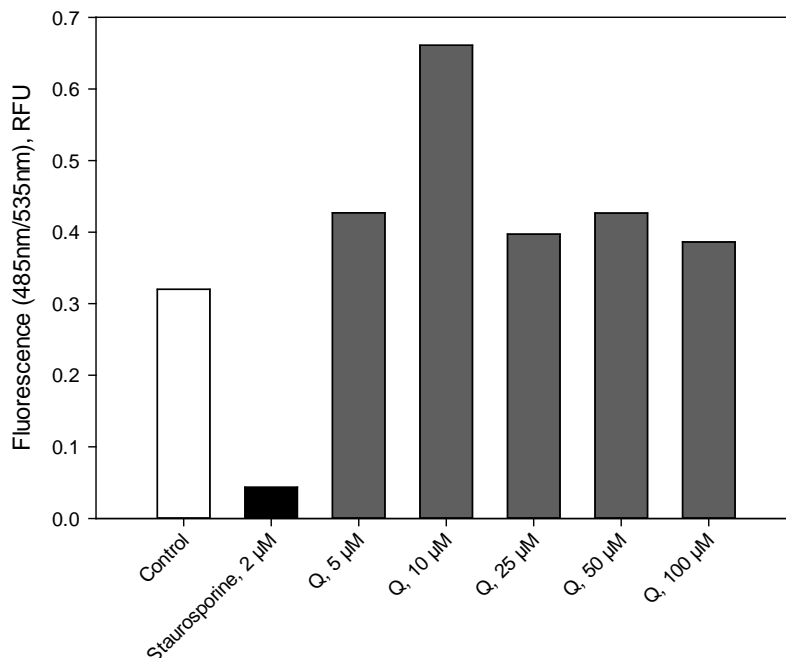


**Фигура 27. Ефекти третирането с кверцитин и дихидрокверцитин върху генерирането на свободни кислородни радикали при нормални човешки кератиноцити.**

Легенда: Q - кверцитин, DHQ – дихидрокверцитин, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водороден пероксид.

При третирането на нормални кератиноцити с нарастващи концентрации на кверцитин и дихидрокверцитин беше установено повишаване на нивата на свободни радикали, на база на повишената флуоресценция дължаща се на DCF, но това повишаване на ROS беше значително по-слабо изразено от наблюдаваното при третиране на кератиноцитите с 5% водороден пероксид (*фигура 27*). Използваната относително висока концентрация на водороден пероксид доведе до многократно повишаване на нивата на ROS, които бяха над 6 пъти по-високи от установените при контролни, нетретирани клетки. Подобно нива на свободни радикали в клетката водят до индукция на остър оксидативен стрес, необратимо увреждане на клетката и индукция на клетъчна смърт. При нито една от използваните концентрации на кверцитин и на дихидрокверцитин не беше установено подобно рязко повишаване на нивата на свободни радикали, индикиращо проявата на про-оксидантно действие от страна на тези два флавоноида. Ниските стойности за флуоресценцията на DCF при третирани със стауроспорин кератиноцити бяха резултат от индукцията на клетъчна

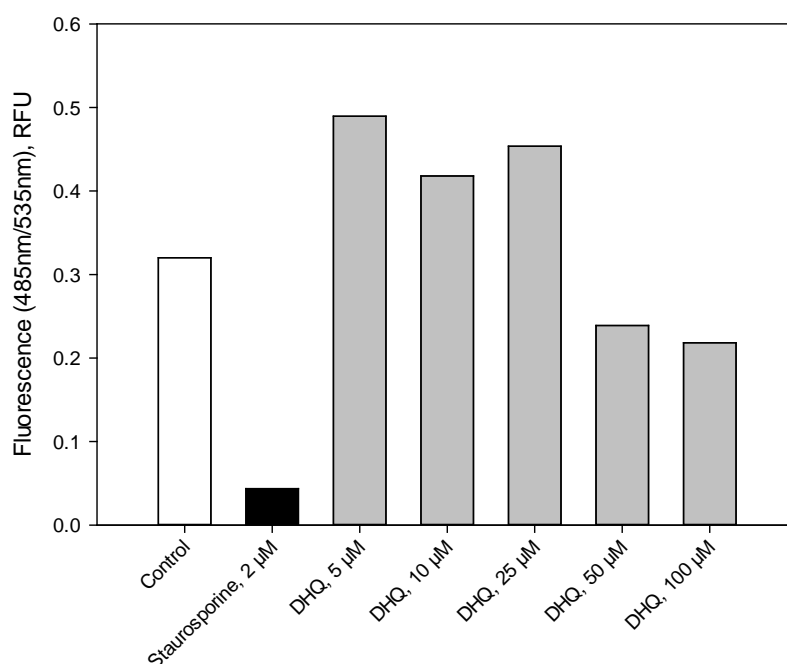
смърт под действие на този киназен инхибитор, а не бяха резултат от антиоксидантно действие на стауроспорина. Намаленият брой живи клетки при третиране със стауроспорин води до намаляване на нивата на съответните ензими и съответно много по-малка част от DCFDA се окисляваше до до флуоресцентния продукт DCF.



**Фигура 28. Ефекти на третирането с кверцитин (Q) върху генерирането на свободни кислородни радикали при нормални човешки кератиноцити.**

Третирането на нормални кератиноцити с нарастващи концентрации на кверцитин водеше до повишаване на нивата на свободни радикали, но не беше установена концентрационна зависимост (фигура 28). Напротив, нивата на свободни радикали (на база на флуоресценцията на DCF) бяха по-високи при ниски концентрации и особено при концентрация 10 μM кверцитин, при която флуоресценцията бе над 2 пъти по-висока от установената при контролни, нетретиранни кератиноцити. При същата концентрация на кверцитин беше установена и най-ниска преживяемост на клетките (фигура 20) и може да се хипотезира, че именно повишените нива на свободни радикали в клетката водят и до намаляване на клетъчната преживяемост, но са необходими допълнителни анализи които да потвърдят или оборят тази хипотеза.

На база на резултатите за нивата на свободни радикали може също така да се хипотезира, че в зависимост от използваната концентрация, кверцитина може да действа както като антиоксидант, така и като про-оксидант, като при настоящите експерименти използването на концентрация от 10 μM водеше до проявата на про-оксидативни ефекти, като същевременно нито една от останалите използвани концентрации не водеше до значителен антиоксидантен ефект.



**Фигура 29. Ефекти на третирането с дихидрокверцитин (DHQ) върху генерирането на свободни кислородни радикали при нормални човешки кератиноцити.**

При третирането на нормални човешки кератиноцити с дихидрокверцитин, беше наблюдавано повишаване на нивата на свободни радикали при ниски концентрации (5-25  $\mu$ M) (фигура 29), като при 5  $\mu$ M и 10  $\mu$ M беше установен и по-силен инхибиторен ефект по отношение на клетъчната преживяемост (фигура 22). При високи концентрации (50  $\mu$ M и 100  $\mu$ M) се наблюдаваше намаляване на нивата на ROS, като стойностите бяха по-ниски от установените при контролни, нетретиранни клетки. Това снижаване на нивата на свободни радикали би могло да е резултат от намалената клетъчна преживяемост (фигура 22 и фигура 23), но не е изключено да бъде и резултат от антиоксидантното действие на дихидрокверцитина в тази концентрационна област. За изясняването на точната причина водеща до снижаване на нивата на ROS при третиране на нормални кератиноцити с дихидрокверцитин, е необходимо провеждането на допълнителни експерименти, при които нивата на свободни радикали да бъдат определени с помощта на алтернативен биомаркер.

Дълго време в научната литературата съществуваше догма, че дадена молекула може да действа или само като оксидант или само като антиоксидант, но в последните години се натрупват все повече данни, че редица съединения могат да проявяват както антиоксидантни, така и про-оксидантни свойства [201, 202] като точния ефект на дадена молекула се определя както от нейната концентрация, така и от структурата ѝ. При настоящите експерименти бяха използвани два структурно сходни флавоноида от растителен произход, които обаче проявяват различни ефекти върху генерирането на свободни радикали при нормални човешки кератиноцити. Докато в използваната концентрационна област (5 – 100  $\mu$ M) кверцитина проявява по-скоро про-оксидантно

действие, то в същия концентрационен диапазон дихидрокверцитина проявява както про-оксидантни ефекти (при концентрация между 5 и 25  $\mu\text{M}$ ), но при по-висока концентрация (50  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) тази молекула привидно проявява антиоксидантно действие. Намалените нива на свободни радикали при третиране с високи концентрации на дихидрокверцитин обаче не е изключено да се дължат и на понижаване на клетъчната преживяемост и следователно намален капацитет на клетъчната култура за окисление на DCFDA до флуоресцентния продукт DCF.

Невъзможността за правилно корелиране на данните за клетъчната преживяемост и за генерирането на свободни радикали поради липсата на надежден референтен маркер (общото количество белтък не беше подходящо при настоящия експеримент) налага провеждането на допълнителни анализи, при които да бъдат използвани алтернативни маркери за оксидативен стрес, включително определяне нивата на определени представители на ейкозаноидите (по-специално на семейството на простагландините) и на активността на антиоксидантни и окислителни ензими в клетката. За съжаление дори използването на алтернативни биомаркери за оценка на редокс-статуса на клетката не би могло недвусмислено да покаже какъв е точния механизъм на действие на дихидрокверцитина (а също така и на кверцитина) при нормални човешки кератиноцити, изолирани от възрастни индивиди. Изясняването на точните механизми на повлияване на кверцитина и особено на дихидрокверцитина изисква мащабни изследвания, при които класическите подходи за изучаване на сигнално-трансдукционните пътища в клетката трябва да бъдат съчетани със съвременните – омикс технологии.

## ИЗВОДИ

- Третирането на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид с инхибитора на ROCK киназите Y27632 води до запазване на пролиферативния капацитет на клетките и избягване на индукцията на репликативен сенесценс, възникващ при продължителното култивиране на нормални кератиноцити в отсъствието на инхибитора. Третирането с инхибитора Y27632 води и до запазване на нормалната клетъчна морфология.
- Третирането на hTERT-имортализирани кератиноцити с ROCK киназия инхибитор Y27632 не води до промени в пролиферативния капацитет на клетката и в клетъчната морфология. При hTERT-имортализираните човешки кератиноцити при продължително култивиране не настъпват промени в структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени, независимо от присъствието или отсъствието на инхибитора Y27632 в културалната среда.
- В хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити се наблюдава намаляване на броя и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени, като същевременно не се наблюдават промени в богатите на холестерол мембранни домени.
- При репликативен сенесценс се наблюдава повишаване на нивата на експресия на киселата сфингомиелиназа (aSMase), докато тези на сфингомиелин синтаза 2 (SMS2) се понижават, а експресията на неутрална сфингомиелиназа 1 (nSMase1) се запазва. Наблюдаваните промени в експресията на тези ензими вероятно са свързани и със наблюдаваните промени в структурата и състава на обогатените на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в хода на настъпване на репликативен сенесценс.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 води до запазване на структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана. Запазването на количественото съдържание на сфингомиелин предполага и запазване на функционалността на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени.
- При нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс се наблюдава загуба на активността и на количеството на рецепторната киназа EGFR, независимо от запазването на богатите на холестерол субмикрометрични липидни домени, с които белтъка се асоциира. При индукция на сенесценс се запазват нивата на активната форма и на тоталното количество на p38 MAPK, която играе ключова роля при стресовите отговори на клетката.
- При третиране с ROCK инхибитора Y27632 се запазват нивата на активната форма и тоталното количество на рецепторната тирозин киназа EGFR, а също така и на серин/треонин киназата ERK1/2, която подобно на p38 MAPK играе роля в отговора на клетката на външни стимули. Запазването на нивата на тези

важни регулаторни ензими вследствие репресия на репликативния сенесценс предполага и запазване на техните функционални роли.

- Третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 води до запазване на нивата на инхибитора на циклин-зависимите кинази p16<sup>INK4a</sup>, което е индикативно за репресия на репликативния сенесценс.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин води до понижаване на клетъчната преживяемост и значителни морфологични изменения, несъответстващи на наблюдаваните при индукция на класическия апоптотичен път под действие на неспецифичния киназен инхибитор стауроспорин. Необходими са допълнителни експерименти, чрез които да бъде установен точния механизъм на повлияване.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин води до повишаване на нивата на свободни радикали в клетката, което е индикативно за про-оксидантно действие на кверцитина в концентрационния диапазон от 5 до 100  $\mu\text{M}$ .
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с ниски концентрации (5-25  $\mu\text{M}$ ) на дихидрокверцитин води до генерането на свободни радикали и проявата на про-оксидантни ефекти. Използването на по-високи концентрации на дихидрокверцитин (50 и 100  $\mu\text{M}$ ) води до снижаване на нивата на свободни радикали, като е възможно това да е резултат от проявата на антиоксидантно действие.
- Необходимо е провеждането на допълнителни експерименти, които да изяснят точните механизми на действие на кверцитина и дихидрокверцитина при нормални човешки кератиноцити, преди да бъде възможно прилагането на тези два флавоноида при модулацията на процесите на клетъчна смърт и/или клетъчно стареене.

## НАУЧНИ ПРИНОСИ

- Беше установено за първи път, че в хода на настъпване на репликативен сенесценс настъпват промени в богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, но не и в богатите на холестерол липидни рафтове.
- За първи път беше установено, че третирането на нормални човешки кератиноцити в условията на монокултура с инхибитора на ROCK киназите Y27632 води до избягване на настъпването на репликативен сенесценс.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с инхибитора на ROCK киназите Y27632 води до запазване както на структурата, така и на състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити.
- Установено беше про-оксидантно и антиоксидантно действие на флавоноида дихидрокверцитин при нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид, като точните молекулни механизми на действие на дихидрокверцитина е необходимо да бъдат по-детайлно проучени при тази моделна система.
- Изолираните първични култури от нормални човешки кератиноцити обогатиха наличната клетъчна колекция на Лабораторията по клетъчна сигнализация към катедрата по Медицинска химия и биохимия на Медицинския факултет на МУ-София.

## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Mound A, **Lozanova V**, Warnon C, Hermant M, Robic J, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Tyteca D, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017, 1862(9):958-71.  
**IF (2017) = 4.966**
2. Mound A, Hermant M, **Lozanova V**, Tyteca D, de Rouvroit CL, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. Rôle des microdomaines lipidiques lors de la sénescence des kératinocytes épidermiques. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 2015, 142 (6-7), p. S289  
**IF (2015) = 0.215**
3. Kalenderova S, **Lozanova V**, Praskova M, Lozanov V. UV light stimulated activation of CaMKII in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of Biomedical and Clinical Research*. 2018. (приета за печат)

## ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Mound A, **Lozanova V**, Warnon C, Hermant M, Robic J, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Tyteca D, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017, 1862(9):958-71.

### Забелязани цитирания:

- Conrard L, Stommen A, Cloos AS, Steinkühler J, Dimova R, Pollet H, Tyteca D. Spatial relationship and functional relevance of three lipid domain populations at the erythrocyte surface. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;51(4):1544-65.
- Borodkina AV, Deryabin PI, Griukova AA, Nikolsky NN. To Find and Destroy: Identification and Elimination of Senescent Cells. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2018 Jul 1;12(3):223-33.
- Kandell RM. ASSESSING THE PHOTOPROTECTIVE EFFECTS OF FLUORESCENT SPHINGOMYELIN AGAINST UVB INDUCED DNA DAMAGE IN HUMAN KERATINOCYTES (Doctoral dissertation, California Polytechnic State University, San Luis Obispo). (докторска дисертация)

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. **Весела Лозанова**, Виолета Димитрова, Анелия Василева, Мария Драгнева, Ваньо Митев. Ефекти на кверцитин и дихидрокверцитин върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки кератиноцити. Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология – нови хоризонти“, ИМБ-БАН, 06-07.04.2017, София.
2. Mound A, Warnon C, **Lozanova V**, Guere C, Vie K, Tyteca D, de Rouvroit CL, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. 103 Sphingomyelin concentrates into lipid microdomains only in non-senescent cells and enhances keratinocyte migration. 46th Annual ESDR Meeting, 07-10.09.2016, Munich, Germany.
3. Mound A, **Lozanova V**, Tyteca D, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Chainiaux-Debacq F, Poumay Y. Development of senescence corresponds to the loss of sphingomyelin-enriched submicrometric domains and their associated EGFR-signaling in epidermal keratinocytes. 75th SID Annual Meeting, 11-16.05.2016, Scottsdale, AZ, USA.
4. Mound A, Hermant M, **Lozanova V**, Tyteca D, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Chainiaux-Debacq F, Poumay Y. Imaging membrane lipid microdomains in live human keratinocytes. 45th ESDR Annual Meeting, 09-12.09.2015, Rotterdam, The Netherlands
5. Mound A, **Lozanova V**, Tyteca D, Guere C, Vie K, Lambert C, Chainiaux F, Poumay YG. Lipid microdomains in keratinocyte membranes are characteristics of cells that do not undergo replicative senescence. American Society of Cell Biology (ASCB) Meeting, 12-16.12.2015, San Diego, CA, USA.

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

- Договор №23/2016 от конкурса „Грант“ към Съвета по медицински науки на МУ-София на тема „Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху апоптотичната сигнална каскада при нормални човешки кератиноцити“; участник в изследователския екип.
- Договор №11-Д/2015 от конкурса „Млад изследовател“ към Съвета по медицински науки на тема „Ефекти на кампферол и кампферол-3-глюкозид върху пролиферацията на кератиноцити и зарастването на рани“; изпълнител-докторант на проекта.

## SUMMARY

The caspase-kinase regulatory pathways are among the most important regulatory pathways in mammalian cells and are involved in numerous physiological and pathophysiological processes. Particularly important is the involvement of caspase and kinase enzymes in both the regulation and the implementation of the various programs responsible for programmed cell death, as well as in cell aging and end differentiation processes.

Cell aging or senescence represents a stable arrest in the cell cycle observed for the first time in cells under cell culture conditions that are subsequently detected *in vivo*. Although the molecular mechanisms that determine the choice between regulated cell death and senescence are not fully understood, it is well known that during the embryonic development the processes of senescence and apoptosis can under certain conditions be interchangeable and compensate for defects in any of these two cellular programs. Aging during post-embryonic development has not until recently been the subject of in-depth studies, so the available information in the scientific literature is limited. The senescence of normal human keratinocytes placed under the conditions of monoculture has not been the subject of intensive studies and the available information on the biochemical changes in keratinocytes occurring during senescence is severely limited.

In recent years, the research of lipid composition and structure of biological membranes has attracted the attention of the scientific community, primarily because of the link between dynamic composition and structure of lipid domains in the plasma membrane and cell signaling processes, both under normal physiological conditions and in pathological contexts. One of the main problems and therefore an important challenge in analyzing the structure and composition of the submicrometric lipid domains in the plasma membrane of normal keratinocytes is its complex architecture and the technological limitations of the available lipid shelf methodologies.

In the last few years, the interest of the scientific community has been directed towards revealing the molecular mechanisms of cellular aging in the context of normal body physiology to modulate these mechanisms and / or their regulation to be used for the development of age-related therapies, but also to slow the physiological aging of the body. Natural products, including antioxidant compounds, are of interest in the development of a variety of therapeutic strategies for both pathophysiological processes as well as modulators of different physiological processes.

The aim of the present dissertation was to investigate the lipid raft composition of normal human keratinocytes as well as to determine some of the changes in their composition and organization which occur during cellular senescence. A second goal of our studies was to evaluate the effects of some natural antioxidants on the cellular proliferation and potential implication as modulators of cellular senescence and programmed cell death.

As a result we were able to visualize both the structure and the changes in the organization of submicrometric lipid domains in the plasma membrane that occur during cellular senescence. It was observed that the changes affected the domains enriched in sphingomyeline, but not those enriched in cholesterol. The changes in the sphingomyelin-enriched domains as well as the induction of cellular senescence were also found to be reversible since inhibition of cellular senescence with the ROCK kinase inhibitor Y27632 was

able to preserve the proliferative capacity and the membrane organization of normal human keratinocytes grown under autocrine conditions.

The antioxidants quercetin and dihydroquercetin are among the most abundant flavonoids in plants whose biological effects are well documented in different cell cultures but not in normal human keratinocytes. In the present dissertation we evaluated their effects on both cell proliferation and the generation of free radicals that are triggers of both cellular death and senescence.

Treatment of normal human keratinocytes with increasing concentrations of quercetin and dihydroquercetin led to a reduction in cell viability but the  $IC_{50}$  values for these two compounds apparently are above the used concentration range (5 – 100  $\mu$ M) since for all tested concentrations the viability was above 50% of the control cells. Low concentration of quercetin resulted in a more pronounced reduction of cell viability and there wasn't a dose-dependency in its growth inhibitory activity. However, for dihydroquercetin was observed a dose-dependent reduction of cell viability, especially when shorter incubation periods were used.

Quercetin and dihydroquercetin also induced changes in the redox status of the cell and generation of free radical with dihydroquercetin having both pro-oxidant and anti-oxidant effects depending on the concentration been used. As for quercetin in the tested concentration range these molecule had only minor pro-oxidant activity and no concentration dependency was proven.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

*Реализирането на настоящата дисертационна работа не би било възможно без подкрепата и съветите от страна на моето семейство, за които съм им безкрайно благодарна!*

*Благодаря и на всички свои приятели, които ме подкрепяха и търпяха през изминалите няколко години! Обещавам ви, че вече ще мога да ви обърна повече внимание и няма да бъда вечно в лабораторията с любимите си „домашни любимци“!*

*Благодаря и на колегите от катедрата по Химия и Биохимия и по-специално на хората от Лабораторията по анализ и синтез на биологично активни вещества, които ме подкрепяха през последните години и ме напътстваха по трудния път!*

*Искрено съм благодарна и на научния си ръководител Акад. Ваньо Митев за предоставената възможност за реализиране на настоящата дисертационна работа, а също така и за възможността да отида на обмен в една от най-добрите лаборатории за работа с кератиноцитни култури.*

*Изказвам своите благодарности и към Международния отдел към МУ-София и координаторите на програмата Еразъм +, които ми съдействаха за успешното реализиране на обмен по тази програма в Университета на Намюр, Белгия, където бяха реализирани значителна част от експериментите, включени в настоящата дисертационна работа.*

*Благодаря на Prof. Yves Poumay и на неговия екип от Laboratoire cellules et tissus (LabCeTi) и най-вече на Adballah Mound и Valerie de Glas, които ми помогнаха изключително много, за да навляза в тънкостите, свързани с изследването на кератиноцити и ми съдействаха за успешното реализиране на значителна част от експериментите.*

*Благодаря и на колегите от клиниката по Пластично-естетична и възстановителна хирургия към УМБАЛ „Александровска“ за предоставените тъканни експланти, използвани при реализирането на част от експериментите, свързани с дисертацията ми.*